

# Entwicklung von Anionenrezeptoren auf Basis von Cyclopeptiden und Bis(cyclopeptiden)

vom Fachbereich Chemie der  
Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
'Doktor der Naturwissenschaften'  
genehmigte Dissertation

D 386



Datum der Aussprache: 30.08.2013

vorgelegt von

**Astrid Schaly**

geboren in Saarbrücken

Betreuer: **Prof. Dr. Stefan Kubik**

Kaiserslautern, 2013



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. S. Kubik im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Zeit von Juni 2008 bis Juli 2013 angefertigt.

Dekan	Prof. Dr.-Ing. J. Hartung
Vorsitzender der Prüfungskommission	Prof. Dr. W. Trommer
1.Gutachter	Prof. Dr. S. Kubik
2.Gutachter	Prof. Dr. L. Gooßen

Datum der Einreichung: 24.07.2013

Datum der Promotion: 30.08.2013



Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Kaiserslautern, den



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Kubik für das interessante und perspektivenreiche Thema, seine stets engagierte Betreuung sowie für die vielen anregenden und aufschlussreichen Diskussionen. Seine motivierenden Worte und seine Geduld haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich allen ehemaligen sowie aktuellen Arbeitsgruppenkollegen Raquel Belda Vidal, Eugenia Petkova Eugenieva-Ilieva, Thomas Fiehn, Alexander Ganß, Laura Gilberg, Michaela Hamm, Michaela Klische, Martin Krause, Arnold Leidner, Disha Mungalpara, Stefanie Noé, Johannes Pitsch, Linda Porté, Luzian Porwol, Carsten Reyheller, Christian Schneider, Fabian Sommer, Sabine Stüwe, Serap Yapar und Michael Zengerle für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, ihre Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Vielen Dank auch für einige viele Unternehmungen, das Teilen von Frust aber auch Freude und unzählige lustige Stunden.

Den Forschungspraktikanten Alexander Heyer, Luzian Porwol und Lisa Kraft sowie dem Staatsexamenskandidaten Martin Schaubel danke ich für präperative Beiträge zu dieser Arbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitskreise von Prof. Dr. L. Gooßen und Prof. Dr. Ing. J. Hartung danke ich für die freundliche Zusammenarbeit. Zudem danke ich Prof. Dr. L. Gooßen für die Zweitkorrektur meiner Arbeit und Prof. Dr. W. Trommer danke ich für die Übernahme des Prüfungskommissionsvorsitzes. Außerdem möchte ich mich bei unserer guten Seele im Sekretariat Frau S. Zeigner für Ihre Hilfestellung bei bürokratischen Problemen sowie bei Bestellungen bedanken.

Außerdem möchte ich meinen Dank an unsere Kooperationspartner Prof. Enrique García-España sowie Raquel Belda von der Universidad de Valencia, Spanien aussprechen, die mir bei der Aufnahme der UV-Spektren sowie der Potentiometrie hilfreich zur Seite standen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. K. Rissanen von der University of Jyväskylä, Finnland für das Lösen der Kristallstrukturen und der Hilfe bei Fragestellungen zu dengleichen.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich Christiane Müller sowie den Mitarbeitern der Analytik Dr. Uwe Bergsträßer, Ruth Bergsträßer, Elke Biehl, Birgit Dusch und Jana Ellmer für die Elementaranalysen. Den Mitarbeitern der physikalischen Chemie Fabian Menges, Jennifer Meyer und Sandra Schäfer danke ich für die Aufnahme der ESI-MS Spektren und die Hilfestellung bei der LC-MS Analyse. Dem Team der Chemikalienausgabe Jürgen Rahm, Frank Schröder und Ludvik Napast für die Versorgung mit Chemikalien und ihren Kampfgeist bei den ChemCups, sowie den Mitarbeitern der Glasbläserei für die Reparatur und Anfertigung diverser Glasgeräte.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der letzten fünf Jahre.



## Abkürzungsverzeichnis

1,2-edt	1,2-Ethandithiol
Aba	3-Aminobenzoessäure
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
Apa	6-Aminopicolinsäure
Apro	(4 <i>R</i> )-4-Aminoprolin
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzyl
d. Th.	der Theorie
DCC	dynamische kombinatorische Chemie
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E <sup>0</sup>	Normalpotential
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
equiv	Äquivalente
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyp	(4 <i>R</i> )-4-Hydroxyprolin
i.Vak.	im Vakuum
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
LM	Lösungsmittel
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
Me	Methyl

MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
Ms	Mesyl
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NOE	Nuclear Overhauser Effect
p.a.	pro analysi
PBP	Phosphat-bindendes Protein
Pd/C	Palladium auf Kohle
PFP	Pentafluorphenol
Ph	Phenyl
$pK_s$	Säurekonstante
ppm	parts per million
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
RP	Reversed Phase
SBP	Sulfat-bindendes Protein
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMOF	Orthoameisensäuretrimethylester
Tpro	(4 <i>S</i> )-4-Thioprolin
tren	Tris(2-aminoethyl)amin
Ts	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
v.a.	vor allem
Z	Benzyloxycarbonyl

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Synthese und Untersuchung eines wasserlöslichen Cyclopeptids .....</b>	<b>11</b>
2.1	Einleitung .....	11
2.2	Aufgabenstellung.....	22
2.3	Ergebnisse.....	24
2.3.1	Synthese.....	24
2.3.2	Bindungsstudien .....	41
2.4	Diskussion .....	60
2.5	Zusammenfassung .....	63
2.6	Ausblick.....	65
<b>3</b>	<b>Synthese und Untersuchung eines dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) .....</b>	<b>66</b>
3.1	Einleitung .....	66
3.2	Aufgabenstellung.....	74
3.3	Ergebnisse.....	75
3.3.1	Syntheseoptimierung .....	75
3.3.2	Bindungsstudien .....	89
3.4	Diskussion .....	91
3.5	Zusammenfassung .....	94
3.6	Ausblick.....	95
<b>4</b>	<b>Aufbau komplexer Strukturen über Imin-verbrückte Cyclopeptide .....</b>	<b>96</b>
4.1	Einleitung .....	96
4.2	Aufgabenstellung.....	99
4.3	Synthese und Untersuchungen .....	100
4.3.1	Iminbildung.....	100
4.3.2	Reduktive Aminierung.....	103
4.4	Zusammenfassung .....	106
4.5	Ausblick.....	106
<b>5</b>	<b>Optimierung der Peptidbindungsknüpfung.....</b>	<b>107</b>
5.1	Einleitung .....	107
5.2	Aufgabenstellung.....	115
5.3	Ergebnisse.....	115
5.4	Diskussion .....	119
5.5	Zusammenfassung .....	120
5.6	Ausblick.....	120

<b>6 Experimenteller Teil.....</b>	<b>122</b>
6.1 Apparatives.....	122
6.2 Chemikalien.....	124
6.3 Messungen.....	125
6.3.1 ITC-Messungen .....	125
6.3.2 Potentiometrische Messungen .....	126
6.3.3 UV-Titrationsen .....	130
6.4 Synthesen.....	133
6.4.1 Allgemeines .....	133
6.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	134
6.4.3 Tripyrrolidinophosphinoxid.....	136
6.4.4 PyCloP .....	136
6.4.5 Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0).....	137
6.4.6 <i>N</i> -Acetyl-2-amino-6-methylpyridin.....	138
6.4.7 <i>N</i> -Acetyl-6-aminopicolinsäure .....	138
6.4.8 6-Aminopicolinsäure .....	139
6.4.9 6-Aminopicolinsäureallylester.....	139
6.4.10 6-Aminopicolinsäuremethylester.....	140
6.4.11 Boc-Hyp-OH.....	141
6.4.12 Boc-Hyp-OMe .....	141
6.4.13 Boc-Hyp-NH <sub>2</sub> .....	142
6.4.14 Boc-4 <i>S</i> -(Ms)Hyp-OMe .....	143
6.4.15 Boc-(Azido)Pro-OMe .....	143
6.4.16 Boc-Apro-OMe.....	144
6.4.17 Boc-(Z-β-Ala)Apro-OMe .....	145
6.4.18 Boc-(β-Ala)Apro-OMe .....	146
6.4.19 Boc-4 <i>S</i> -(Ms)Hyp-OH .....	146
6.4.20 Boc-4 <i>S</i> -(Ms)Hyp-Apa-OMe .....	147
6.4.21 Boc-(Azido)Pro-Apa-OMe .....	148
6.4.22 Boc-Apro-Apa-OMe.....	149
6.4.23 Boc-(Z-β-Ala)Apro-Apa-OMe .....	150
6.4.24 Boc-(β-Ala)Apro-Apa-OMe .....	151
6.4.25 Boc-(Z)Apro-Apa-OMe.....	152
6.4.26 Boc-Hyp-Apa-OEt.....	153
6.4.27 Boc-Hyp-Apa-OAll .....	154
6.4.28 Boc-(Ts)Hyp-Apa-OAll.....	155
6.4.29 Boc-(Bz)Tpro-Apa-OAll .....	156
6.4.30 Boc-[(Azido)Pro-Apa] <sub>2</sub> -OMe .....	157

6.4.31	Boc-[(Azido)Pro-Apa] <sub>3</sub> -OMe .....	157
6.4.32	<i>cyclo</i> [(Azido)Pro-Apa] <sub>3</sub> .....	158
6.4.33	Boc-[(Z-β-Ala)Apro-Apa] <sub>2</sub> -OMe .....	159
6.4.34	Boc-[(Z-β-Ala)Apro-Apa] <sub>3</sub> -OMe .....	160
6.4.35	Boc-[(Z)Apro-Apa] <sub>2</sub> -OMe .....	160
6.4.36	Boc-[(Z)Apro-Apa] <sub>3</sub> -OMe 34 .....	161
6.4.37	<i>cyclo</i> {[(Z)Apro-Apa] <sub>3</sub> } .....	162
6.4.38	<i>cyclo</i> {[Apro-Apa] <sub>3</sub> } .....	163
6.4.39	Aktivester Z-β-Ala-OPFP .....	163
6.4.40	<i>cyclo</i> {[(Z-β-Ala)Apro-Apa] <sub>3</sub> } .....	164
6.4.41	<i>cyclo</i> {[(β-Ala)Apro-Apa] <sub>3</sub> } .....	166
6.4.42	Boc-(Bz)Tpro-Apa] <sub>2</sub> -OAll .....	167
6.4.43	Boc-(Bz)Tpro-Apa] <sub>3</sub> -OAll .....	168
6.4.44	<i>cyclo</i> {[(Bz)Tpro-Apa] <sub>3</sub> } .....	168
6.4.45	<i>cyclo</i> {[Tpro-Apa] <sub>3</sub> } .....	170
6.4.46	Optimierung der Bibliothekzusammensetzung .....	171
6.4.47	Bis( <i>cyclo</i> {[Tpro-Apa] <sub>3</sub> } <sub>2</sub> [1,2-edt] <sub>3</sub> ) .....	177
6.4.48	Katalysereaktionen .....	186
6.5	Untersuchungen zur Iminbildung .....	190
6.5.1	Iminbildung mit einfachen Systemen .....	190
6.5.2	Iminbildung nach Nitschke .....	190
6.5.3	Reduktive Aminierung .....	191
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>193</b>
7.1	ITC .....	193
7.2	Responsefaktor .....	195
7.3	<sup>1</sup> H-NMR Spektren .....	196
7.3.1	Reaktion zwischen tren und 2-Formylpyridin in DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	196
7.3.2	Reaktion zwischen <b>2</b> und 2-Formylpyridin mit Eisen(II)salzen .....	196
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>197</b>



## 1 Einleitung

Wasser ist die Grundlage des Lebens auf unserem Planeten. Ungefähr 72 % der Erdoberfläche sind mit Wasser bedeckt und der menschliche Körper besteht zu über 70 % aus Wasser. So ist es nicht verwunderlich, dass Wasser bei fast allen Stoffwechselvorgängen sowie anderen essentiellen biochemischen Prozessen in der Natur eine entscheidende Rolle spielt. Verantwortlich hierfür sind vor allem die besonderen Eigenschaften des Wassers als Lösungsmittel, die es aufgrund seines polaren Charakters besitzt. Bedingt durch die unterschiedlichen Elektronegativitäten von Wasserstoff und Sauerstoff weist das Wassermolekül ausgeprägte Partialladungen auf. Das Sauerstoffatom trägt dabei eine negative Partialladung und die beiden Wasserstoffatome positive, woraus für das Wassermolekül insgesamt ein Dipolmoment resultiert. Dadurch wird die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Sauerstoff- und den Wasserstoffatomen ermöglicht. Ein Sauerstoffatom ist in dem entstehenden Verbund aus mehreren Wassermolekülen im Idealfall tetraedrisch von vier Wasserstoffatomen umgeben (Abb. 1a). Diese gerichtete Wechselwirkung sorgt dafür, dass die Wassermoleküle in einem definierten Abstand zueinander gehalten werden. Wasser ist dadurch nicht so dicht gepackt wie andere Lösungsmittel. Mit Hilfe von Neutronenstreuung und Computersimulationen konnte gezeigt werden, dass ein Wassermolekül in flüssigem Wasser an durchschnittlich 3.5 Nachbarmoleküle gebunden wird.<sup>[1]</sup> Außerdem kann es laut Simulationen von Sciortino zu Defekten in der Grundstruktur kommen, wenn eine Gabelung vorliegt, also wenn ein Wasserstoffatom über zwei Sauerstoffatomen gebunden wird (Abb. 1b).<sup>[2]</sup> Dass dabei nicht alle Bindungsstellen besetzt sind, führt zu einer gewissen Mobilität bzw. Dynamik, da innerhalb des Netzwerks ständig Wasserstoffbrücken gebrochen und neu gebildet werden (die Lebensdauer einer Wasserstoffbrücke liegt bei ungefähr 1 ps).

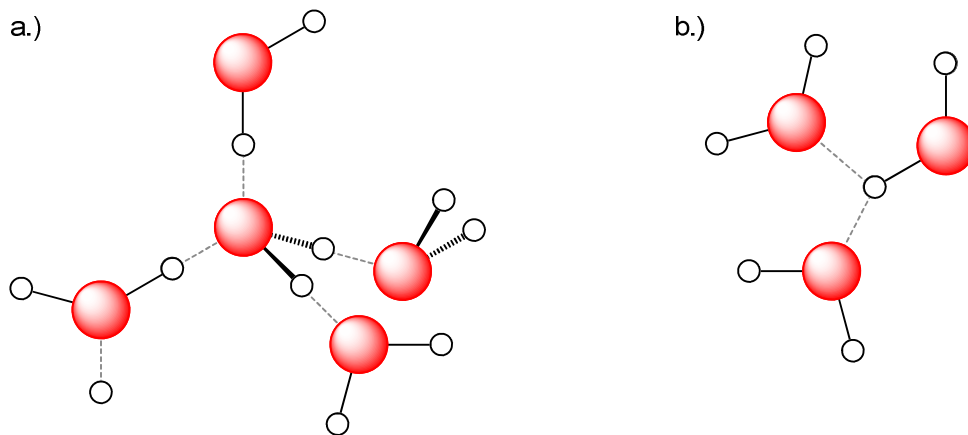


Abb. 1: a.) Tetraedrisch koordiniertes Sauerstoffatom im Wasserstoffbrückennetzwerk, b.) Defekt der Grundstruktur durch Gabelung.

Weiterhin löst Wasser aufgrund der ausgeprägten Dipolmomente von Wassermolekülen und der daraus resultierenden hohen Dielektrizitätskonstante des Mediums polare, hydrophile Moleküle sehr gut, da sie über Coulombkräfte mit dem Lösungsmittel wechselwirken. Zu gut wasserlöslichen Substanzen gehören weiterhin viele Salze, die aus Komponenten mit permanenten Ladungen, Kationen und Anionen, aufgebaut sind. Hydrophobe Moleküle hingegen aggregieren in Gegenwart von Wasser, um so die Kontaktfläche mit umgebenden Lösungsmittelmolekülen zu verringern. Dieses Verhalten wird beispielsweise bei der Proteinfaltung beobachtet. Dabei ist dieser sogenannte hydrophobe Effekt oft Entropiegetrieben, da bei der Aggregation von unpolaren Verbindungen die umgebenden Wassermoleküle freigesetzt werden.<sup>[3]</sup>

Für die Stoffwechselprozesse, die in unserem Körper ablaufen, ist es unentbehrlich, dass die Substrate mit einer hohen Affinität und Selektivität an ihre jeweiligen Reaktionspartner gebunden werden. Angesichts der Besonderheiten, die Wasser als Lösungsmittel besitzt, greift die Natur auf besondere Mechanismen zurück, um die benötigte Selektivität der Substratbindung gewährleisten zu können. So werden die Substrate über eine Kombination aus schwachen reversiblen Bindungen, wie Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, dipolaren Bindungen oder auch koordinativen Wechselwirkungen gebunden. Als Bindungspartner fungieren meist Proteine, die aus linearen oder auch verzweigten Proteinketten aufgebaut sind. Erste Vorstellungen zur Wirkweise von Enzymen, einer wichtigen Klasse von Proteinen, formulierte 1894 Emil Fischer mit dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, das besagt, dass ein Substrat eine zu dem aktiven Zentrum des Enzyms, von dem es umgesetzt wird, komplementäre Geometrie aufweisen muss.<sup>[4]</sup> 1958 wurde diese Annahme von Koshland



durch die Induced-Fit-Theorie verfeinert. Danach können sowohl das Substrat als auch das Protein bei Komplexbildung ihre Konformation so anpassen, dass intermolekulare Wechselwirkungen optimiert werden.<sup>[5]</sup> Bei Ausbildung des Komplexes müssen sowohl bei dem Substrat als auch bei dem Enzym die Hydrathüllen abgestreift werden. Dazu muss das Wasserstoffbrückennetzwerk reorganisiert werden, was einen Energiebetrag erfordern kann, der bei Komplexbildung aufgebracht werden muss. Ebenso ist Wasser ein stark kompetitives Lösungsmittel, d.h. die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Substrat müssen mit den Wechselwirkungen zum umgebenden Lösungsmittel konkurrieren. Bei Enzymen ist in diesem Falle von Vorteil, dass der Bindungsvorgang im aktiven Zentrum abgeschirmt vom umgebenden Lösungsmittel stattfindet. So kann die Konkurrenz weitestgehend ausgeschaltet werden. Die Abschirmung resultiert dabei aus der dreidimensionalen Struktur des Enzyms, da sich dieses durch den hydrophoben Effekt relativ kompakt faltet.

In der supramolekularen Chemie ist ein wichtiges Ziel, synthetische Rezeptoren nach dem Vorbild der Natur zu entwickeln, die ein Substrat über nicht-kovalente Wechselwirkungen binden. Diese Rezeptoren sollen als Modellverbindungen für die Imitation biologischer Prozesse dienen, wobei insbesondere die Substratbindung von Proteinen ein Vorbild darstellt.

In meiner Arbeit habe ich mich mit der Entwicklung von künstlichen Rezeptoren für Anionen beschäftigt. Anionen, also Moleküle oder Atome mit negativer Ladung, kommen überall in der Natur vor und sind, ähnlich wie Wasser, essentiell für die Erhaltung des Lebens. So ist die DNA als Träger der genetischen Information ein Polyanion und auch Adenosintriphosphat (ATP), das als Energielieferant in unserem Organismus eine essentielle Rolle spielt, trägt mehrere negative Ladungen.<sup>[6]</sup> Anionen sind in wässrigen Lösungen stark solvatisiert, d.h. die Wassermoleküle in der Hydrathülle können nicht ohne weiteres abgestreift werden. Sie sind im Vergleich zu ihren isoelektronischen Kationen größer und weisen dabei ein kleineres Ladungs/Radius-Verhältnis auf, so dass elektrostatische Wechselwirkungen mit Bindungspartnern tendenziell schwächer sind. Dies spielt eine wichtige Rolle, da viele Enzymsubstrate in biochemischen Prozessen anionischer Natur sind und für deren Bindung also besonders effiziente Bindungsmotive notwendig sind. Analoges gilt für die Entwicklung künstlicher anionenbindender Systeme, sogenannter synthetischer Anionenrezeptoren.

Für die Komplexbildung in Wasser muss zum einen eine hohe Wasserlöslichkeit von Rezeptor und Substrat gewährleistet sein und zum anderen muss die Wechselwirkung die konkurrierende Bindung von Wassermolekülen an Rezeptor und Substrat überkompensieren. Anionen haben als Gäste im Vergleich zu Kationen neben den vorher bereits erwähnten Besonderheiten diesbezüglich noch weitere spezielle Ansprüche. So treten sie in vielen verschiedenen Geometrien auf, was bei der Entwicklung komplementärer Rezeptoren berücksichtigt werden muss. Anionen können eine sphärische, lineare, trigonale, tetraedrische oder oktaedrische Form besitzen. Darüber hinaus hängt der Ladungszustand vieler Anionen vom pH-Wert ab, so dass ein Anionenrezeptor in einem bestimmten pH-Fenster wirksam sein muss, in dem das Anion deprotoniert vorliegt.

Aufgrund der vielfältigen Aspekte, die bei der Entwicklung von Rezeptoren für Anionen berücksichtigt werden müssen, entwickelte sich das Feld der molekularen Erkennung von Anionen langsam. Die ersten Anionenrezeptoren wurden 1968 von Simmons und Park beschrieben.<sup>[7]</sup> Diese sogenannten Katapinanden haben eine bicyclische Grundstruktur, welche zwei verbrückte Ammoniumzentren enthält. Im protoniertem Zustand können diese Verbindungen Anionen, wie z.B. Halogenide, in ihren Hohlraum aufnehmen. Die Katapinanden können dabei, je nach Orientierung der Protonen an den Brückenköpfen, in verschiedenen Konformationen vorliegen (Abb. 2). Die Anionenbindung erfolgt aber nur, wenn die Protonen der Ammoniumgruppen ins Innere des Hohlraumes zeigen. Es konnte mit Hilfe von NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass in Gegenwart von geeigneten Gästen das Konformationsgleichgewicht weit auf der Seite liegt, die für die Anionenbindung am günstigsten ist.

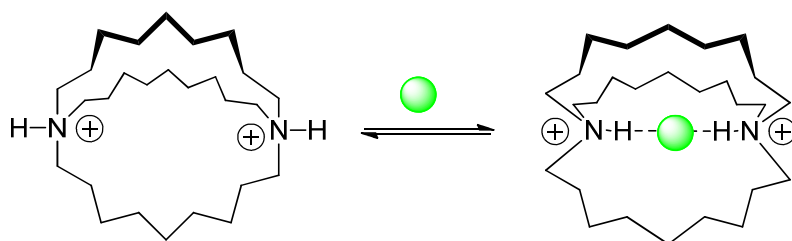


Abb. 2: Konformationsänderung eines Katapinanden bei Anionenbindung.

In den 80er Jahren wurden cyclische Polyamine, Analoga zu den Kationen-bindenden Kronenethern, von Lehn als Anionenrezeptoren in wässrigen Systemen beschrieben (Abb. 3).<sup>[8]</sup> Seitdem wurde das diesen Verbindungen zugrundeliegende Bindungsmotiv häufig zur Bindung von Anionen in wässrigen Lösungen eingesetzt. Vorteil solcher Polyamine ist,

dass sie neben ihrer relativ einfachen synthetischen Zugänglichkeit leicht protonierbar sind. Die so gebildeten Ammoniumgruppen binden maßgeblich über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Gast. Daneben sind Wasserstoffbrücken zwischen den Ammoniumgruppen und Anionen möglich, die zur Stärke der Wechselwirkungen beitragen.

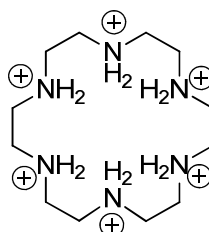


Abb. 3: Polyammoniummakrocyclus.

Ziel der supramolekularen Chemie ist nicht nur die Entwicklung von synthetischen Rezeptoren mit hoher Affinität. Von Bedeutung ist weiterhin eine hohe Selektivität für die Bindung der Substrate. Die hohe Selektivität, die Enzyme bei der Substraterkennung besitzen, ist zu einem großen Teil auf die komplementäre Struktur des aktiven Zentrums zu dem jeweilige Substrat zurückzuführen. Analog bestimmt die strukturelle Komplementarität zwischen Rezeptor und Substrat die Selektivität eines synthetischen Systems. Allerdings sind künstliche Rezeptoren in der Regel wesentlich einfacher aufgebaut als natürliche Systeme und damit ist eine hohe Passgenauigkeit deutlich schwieriger zu realisieren.

Ein weiteres wichtiges Kriterium, das die Bindungsselektivität eines synthetischen Anionenrezeptors bestimmt, ist die Stärke, mit denen Anionen an diesen Rezeptor binden. Diese Stärke korreliert mit der sogenannten Hofmeister-Serie (Abb. 4). Diese wurde 1888 von Franz Hofmeister aufgestellt, der untersucht hatte, welchen Einfluss Salze auf die Löslichkeit von Proteinen haben.<sup>[9]</sup> Im Allgemeinen werden stark polarisierbare Anionen stärker an hydrophobe Bindungsstellen gebunden, wodurch die Löslichkeit von Proteinen in Gegenwart von Anionen, wie  $\text{ClO}_4^-$  oder  $\text{SCN}^-$ , in Wasser steigt.

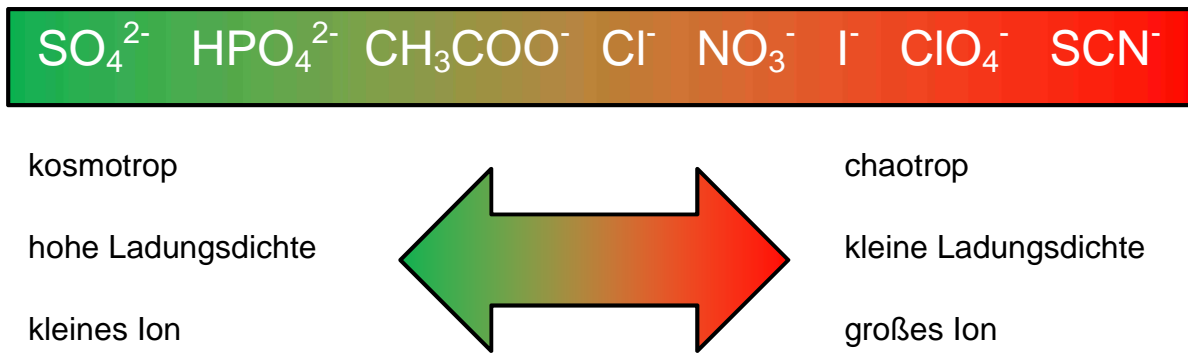


Abb. 4: Hofmeister-Serie für Anionen.

Besonders anspruchsvoll gestaltet sich die Suche nach Wirtmolekülen, die eine Selektivität für Phosphat oder Sulfat aufweisen, da diese besonders hydrophil sind. Sulfat ist ein zweifach negativ geladenes Oxo-Anion mit tetraedrischer Geometrie, welches eine hohe Hydratisierungsenergie ( $-1059 \text{ kJ/mol}$ ) aufweist.<sup>[10]</sup> Formal gesehen sind Sulfate Salze der Schwefelsäure, einer starken zweiprotonigen Säure. Die  $\text{pK}_s$  Werte von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $-3.0$ ) und  $\text{HSO}_4^-$  ( $1.9$ ) zeigen, dass das Sulfatanion in weiten pH-Bereichen als zweifach negativ geladenes Anion vorliegt. Von Bedeutung sind Sulfatanionen z.B. bei der Lagerung von radioaktivem Abfall.<sup>[11]</sup> So enthalten wässrige Lösungen von Pertechneat auch hohe Konzentrationen Sulfat. Ein möglicher Weg der Langzeitlagerung der radioaktiven Rückstände aus diesen Lösungen ist das Verschmelzen in Glasstäben. Sulfatsalze sind allerdings in Borosilikatglas unlöslich und setzen sich auf der Oberfläche der Schmelze als separate Phase ab.<sup>[12]</sup> Die erhaltenen Glasstäbe sind aus diesem Grunde brüchig und für eine Langzeitlagerung ungeeignet. Man ist daher daran interessiert, Sulfatanionen selektiv aus Pertechneatlösungen durch geeignete Extraktionsprozesse zu entfernen. Darüber hinaus ist Sulfat neben anderen Ionen für die permanente Wasserhärte<sup>[13]</sup> sowie sauren Regen verantwortlich, da es sich im Grundwassers absetzt. Aus diesen Gründen wurden Sulfatanionen zu beliebten Substraten in der supramolekularen Chemie. Computer-gestützten Berechnungen zufolge kann ein Sulfation über bis zu zwölf Wasserstoffbrücken gebunden werden.<sup>[14]</sup>

In bestimmten Gram-negativen Bakterienarten dient das Sulfat-bindende Protein (SBP) für den Zelltransport von Sulfatanionen.<sup>[15]</sup> Das Anion wird bei Wechselwirkung mit diesem Protein in eine Bindungstasche eingelagert, wo es völlig vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird. Die Bindung erfolgt über sieben Wasserstoffbrücken, wobei die Bindungsgeometrie einem einfach überbrückten Oktaeder ähnelt (vgl. Abb. 5).<sup>[16]</sup> Elektrostatische Wechselwirkungen sind aufgrund fehlender positiver Ladungen im aktiven Zentrum nicht wirksam. Das Protein besitzt eine Sulfataffinität in einem pH-Bereich von 5–8.1 von ungefähr  $10^6 \text{ M}^{-1}$ .

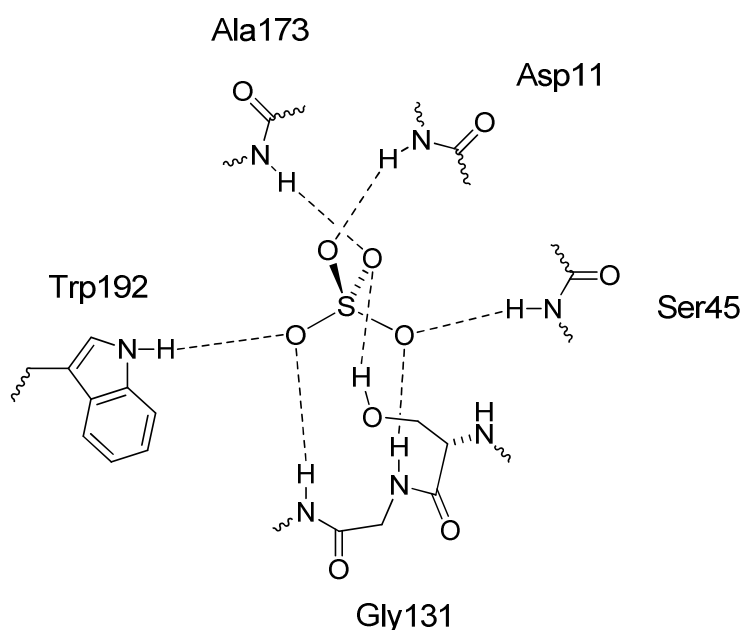


Abb. 5: Ein Sulfation in der Bindungstasche des SBP.

Wie im vorigen Abschnitt bereits angesprochen, ist die komplementäre Umgebung an der Bindungsstelle ein wichtiger Faktor für die Selektivität eines Rezeptors. Diese dreidimensionale Tasche sollte die Struktur des Gastes abbilden und im Falle der Sulfatbindung geeignete Bindungsstellen für das Anion tetraedrisch um einen Hohlraum anordnen. In der supramolekularen Chemie wurde insbesondere versucht, diese Geometrie mit Hilfe von tripodalen oder cyclischen Rezeptorgrundstrukturen zu realisieren. Solche Wirtmoleküle bieten eine Umgebung im Hohlraum, die die Bindung an einen Großteil der Sauerstoffatome des Sulfatanions erlaubt. Grundlage von trigonalen Rezeptoren sind häufig tren (Tris(2-aminoethyl)amin) oder 1,3,5-Triethylbenzolderivate (Abb. 6).



Abb. 6: Grundstrukturen von trigonalen Rezeptoren.

Beispiele für Rezeptoren mit tren-Einheiten sind Azacryptanden, bei denen zwei tren-Moleküle über Spacer verknüpft werden (Abb. 7). Die Bindung eines Sulfations an den protonierten Rezeptor findet in dem Hohlraum statt, der zwischen den beiden tren-Gruppen aufgespannt wird. Von den in Abb. 7 dargestellten Verbindungen in der entsprechenden hexaprotonierten Form bindet der Rezeptor mit den Furanlinkern ( $K_a = 1.62 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) am effektivsten an Sulfationen, während der mit den *m*-Xylyleinheiten um den Faktor 4.4 schwächer bindet ( $K_a = 3.71 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[17]</sup> Eine selektive Bindung dieser Rezeptoren an Sulfat im Vergleich zu anderen Oxoanionen ist jedoch nicht gegeben. So wird Oxalat von dem ersten dargestellten Azacryptand ebenfalls außergewöhnlich stark mit Bindungskonstanten  $K_a > 10^{10} \text{ M}^{-1}$  gebunden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei Komplexbildung stabilisierende  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den C=O Gruppen des Oxalats und den aromatischen Ringen des Rezeptors auftreten.

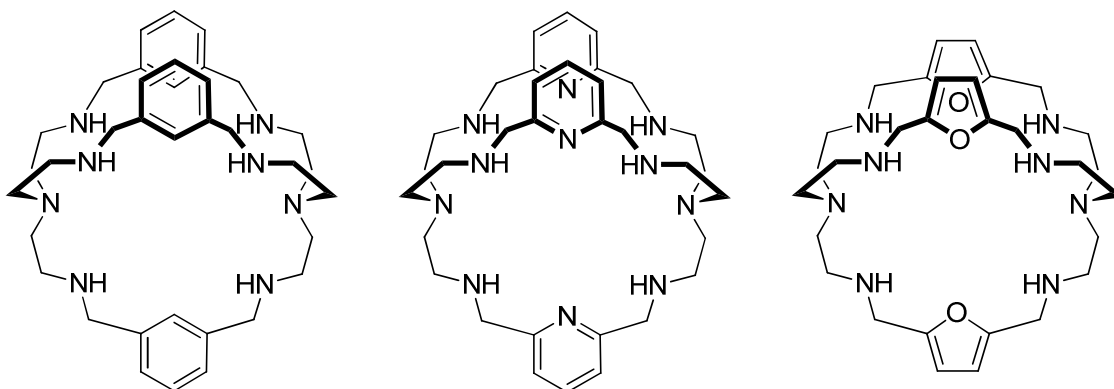


Abb. 7: Struktur verschiedener Azacryptanden auf tren-Basis.

Anwendung finden Sulfatrezeptoren für die Extraktion von Sulfatsalzen aus wässrigen Lösungen, wie bei der eben erwähnten Aufbereitung von radioaktiven Rückständen oder anderer industrieller Abfälle. Problem hierbei ist der hydrophile Charakter und die hohe Hydratisierungsenergie des Sulfatanions im Vergleich zu anderen Anionen, wie z.B. Nitrat oder Chlorid (vergleiche Hofmeister-Serie, Abb. 4), welche eine Extraktion von Sulfatanionen in unpolare Lösungsmittel erschwert.

Ein kürzlich beschriebener Rezeptor, der in der Lage ist, Sulfat selektiv in Gegenwart von Nitrat aus der wässrigen in eine organische Phase zu überführen, ist der in Abb. 8 dargestellte makrocyclische Rezeptor Octamethyl-octaundecylcyclo[8]pyrrol.<sup>[18]</sup> Er ist vom Porphyrin-system abgeleitet und besteht aus acht einfach verbrückten Pyrrolen. Diese tragen lange Alkylketten, um die Löslichkeit in einem hydrophoben Lösungsmittel zu gewährleisten. Mit Hilfe von isopenmarkiertem Sulfat konnte nachgewiesen werden, dass der zweifach protonierte Rezeptor, der als Nitratkomplex eingesetzt wurde, in Anwesenheit von Aliquat 336N als Phasentransferkatalysator Sulfationen in eine Toluol-Phase zu extrahieren vermag und das mit einer beachtlichen Austauschrate von 4.9 Einheiten.<sup>[19]</sup> Das heißt, von den sechs von dem Rezeptor gebundenen Nitratanionen werden ungefähr fünf gegen Sulfat ausgetauscht. Allerdings lässt sich das Cyclo[8]pyrrol aufgrund der langsamen Kinetik des Austausches noch nicht zur Aufbereitung von radioaktiven Abfällen einsetzen.

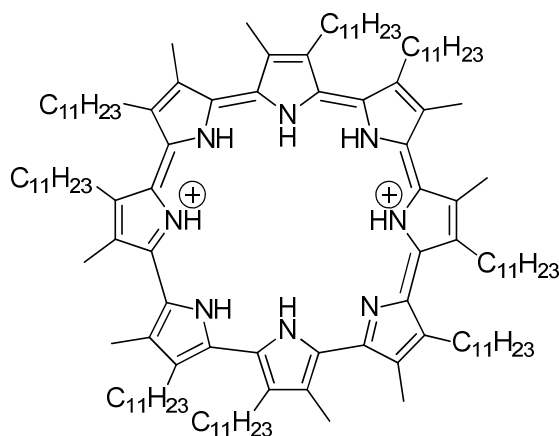


Abb. 8: Cyclo[8]pyrrol als Extraktionsmittel für Sulfat.

Neben der Extraktion dient vor allem auch das selektive Auskristallisieren von Sulfat mit Hilfe von synthetischen Rezeptoren zur Aufbereitung von wässrigen Lösungen. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist das in Abb. 9 dargestellte Molekül, das 2007 von Custelcean und Moyer beschrieben wurde.<sup>[20]</sup> Es besteht aus einer tren-Einheit, an die über Harnstofflinker drei Pyridinreste geknüpft sind. Durch seine zu Sulfat komplementäre Struktur bildet sich in Gegenwart dieses Anions eine Kapsel aus zwei Molekülen des Rezeptors, in deren Hohlraum ein Sulfatanion gebunden ist. Diese Kapseln kristallisieren in einem dreidimensionalen Netzwerk selektiv aus Methanol/Wasser-Gemischen mit einer Ausbeute von bis zu 88 % aus, selbst wenn die Lösung einen 100fachen Überschuss an Nitratanionen enthält. Das Netzwerk wird dabei durch Verbrücken der Kapseln über Wasserstoffbrücken zu  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ -Komplexen stabilisiert, welche gleichzeitig als

Gegenionen zu den zweifach negativ geladenen Anionen fungieren. Die Selektivität bezüglich anderer Oxoanionen folgt dabei dem Trend  $\text{SO}_4^{2-} > \text{SeO}_4^{2-} \gg \text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_3^{2-}$ .

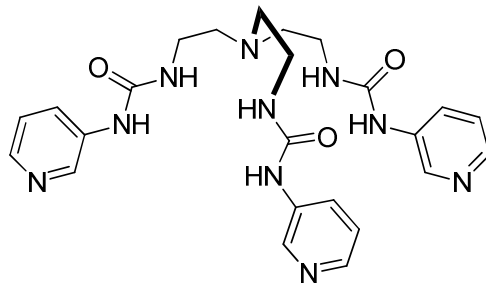


Abb. 9: Rezeptor zur selektiven Bindung von Sulfatanionen und Fixierung in einem Kristallverband.



## 2 Synthese und Untersuchung eines wasserlöslichen Cyclopeptids

### 2.1 Einleitung

In der Einleitung wurden bereits einige Anionenrezeptoren insbesondere für die selektive Bindung von Sulfatanionen vorgestellt. Als Bindungsmotive findet man in diesen Verbindungen hauptsächlich kationische Zentren, die mittels elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Substrat interagieren, sowie Amid- oder Harnstoffgruppen, die an das Substrat über Wasserstoffbrücken binden. Für Erkennungsprozesse in der Natur sind v.a. Proteine verantwortlich, die aus einer linearen oder auch verzweigten Kette aus Aminosäuren aufgebaut sind. Teilweise enthalten Proteine Cofaktoren, niedermolekulare Moleküle, welche mit für deren Funktionsweise verantwortlich sind. Das aktive Zentrum des Sulfat-bindenden Proteins, welches in Abb. 5 gezeigt ist, kommt ohne Cofaktor aus und bindet an das Substrat über die Amid NH-Protonen des Peptidrückgrats und über funktionelle Gruppen in Aminosäureseitenketten. Insgesamt ist der Baukasten der Natur für den Aufbau von Peptiden begrenzt. Lediglich zwanzig Aminosäuren sind proteinogen und damit am Aufbau von Proteinen beteiligt. Die große Vielfalt an verschiedenen, einzigartigen Strukturen kommt durch die Sequenz der Aminosäuren in der Kette (Primärstruktur) und durch die Sekundär- sowie Tertiärstrukturen der Proteine, also deren übergeordnete räumliche Strukturen zustande.

Die Verknüpfung der Aminosäuren in Proteinen erfolgt über Amidbindungen, die in diesem speziellen Fall auch Peptidbindungen genannt werden. Diese Bindungen entstehen durch Kondensation der Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxyfunktion einer anderen Aminosäure. Vorteile dieser Bindung sind ihre Stabilität und ihre Rigidität. Aus dem partiellen Doppelbindungscharakter von Peptidbindungen resultiert auch, dass der Stickstoff nicht basisch ist, da das freie Elektronenpaar an der Konjugation beteiligt ist. Im Sauren wird somit eher der Carbonylsauerstoff protoniert.

Die Amidgruppen sind v.a. auch für die Sekundärstruktur der Peptide verantwortlich. So können sich intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den C=O und den NH-Gruppen der Peptidgruppen entlang des Peptidrückgrats ausbilden und dementsprechend Sekundärstrukturmerkmale, wie Helices oder Faltblätter, stabilisieren. Die Amidgruppe agiert dabei sowohl als Donor als auch als Akzeptor für die Wasserstoffbrücken. Durch die konformative Fixierung der Proteinkette kommt es auch zu einer Ausrichtung der Aminosäure-Seitenketten, bei Helices entlang der Peripherie der gewundenen Kette und von dieser wegweisend, und

bei  $\beta$ -Faltblättern oberhalb und unterhalb der Ebene, die durch die Zick-Zack-förmige Kette definiert wird. Dadurch werden Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten ermöglicht, welche die Tertiärstruktur stabilisieren.

In Anbetracht der Eigenschaften von Amidbindungen und ihrer biologischen Relevanz ist es nicht verwunderlich, dass diese vermehrt auch in synthetischen Rezeptoren eingesetzt wurden. Besonders interessant sind cyclische Wirtmoleküle mit Amiduntereinheiten, da diese im Vergleich zu offenkettigen Analoga für die Substratbindung besser vororganisiert sind und somit generell stabilere Komplexe bilden. Dieser makrocyclische Effekt ist in erster Linie auf thermodynamische Faktoren zurückzuführen.<sup>[21]</sup> So ist der Entropieverlust bei der Komplexbildung cyclischer Rezeptoren geringer als bei offenkettigen, da die konformative Beweglichkeit ringförmiger Verbindungen von vornherein stärker eingeschränkt ist als die offenkettiger. Im Gegensatz dazu sind enthalpische Faktoren bei der Komplexbildung beider Systeme häufig nahezu vergleichbar.

Cyclische Peptide besitzen neben ihrer Stabilität gegenüber Proteasen auch eine physiologische Wirkung, wie man an den vielen Beispielen natürlicher Cyclopeptide erkennen kann. Vorteile dieser Systeme als synthetische Rezeptoren sind unter anderem, dass die Ringgröße durch Veränderung der Kettenlänge variabel ist und so auf die Größe eines beliebigen Gastes angepasst werden kann. Durch die sequentielle Synthese ist eine einfache Modifikation der Bausteine des Peptidgrundgerüsts möglich. Den Untereinheiten der Grundstruktur sind dabei fast keine Grenzen gesetzt, so dass auch hier die Bedürfnisse eines speziellen Gastes berücksichtigt werden können. Durch die erwähnten besonderen Eigenschaften der Amidbindung können Cyclopeptide dabei sowohl als Rezeptoren für geladene Gäste wie Anionen, Kationen und Ionenpaare, aber auch für neutrale Moleküle, wie Kohlenhydrate, fungieren.<sup>[22]</sup> Kationen werden dabei vornehmlich über die Sauerstoffatome der Carbonylgruppe gebunden, während bei der Anionenbindung die Amidprotonen zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken herangezogen werden.

Ein Beispiel für einen Naturstoff mit cyclischer Grundstruktur ist das Cyclodepsipeptid *Valinomycin* (Abb. 10), welches von Gram-positiven Eubakterien, den *Streptomyzeten*, produziert wird. *Valinomycin* ist ein Ionophor, der selektiv Kaliumionen über nach innen gerichtete Carbonyl-Sauerstoffatome bindet und diese anschließend durch Zellmembranen transportiert.<sup>[23]</sup> Die unpolaren Methyl- und *iso*-Propylreste sind dabei nach außen orientiert, wodurch das Äußere des Moleküls hydrophob wird und es sich in die Lipiddoppelschicht

einlagern kann. Die antibakterielle Wirkung von *Valinomycin* ist eine Konsequenz dieser Fähigkeit, denn durch den Transport der Kaliumkationen entlang bakterieller Zellmembranen kommt es zum Zusammenbruch des Membranpotentials und somit zum Absterben des Bakteriums. Die Selektivität von *Valinomycin* für Kaliumionen ist dabei 10.000-mal höher als für Natriumionen, was auf die komplementäre Größe des Valinomycinhohlraums zu dem Kaliumion zurückzuführen ist.

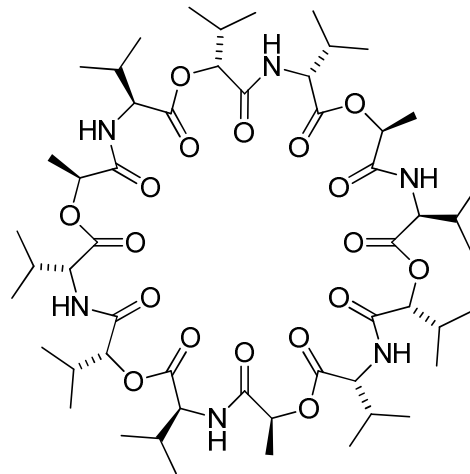


Abb. 10: Struktur des *Valinomycins*.

Cyclische Peptidalkaloide lassen sich vor allem aus marinen Quellen wie z.B. Algen, Pilzen, Schwämmen oder auch Manteltierchen gewinnen (vgl. Abb. 11).<sup>[24]</sup> Sie besitzen antibakterielle, antivirale, entzündungshemmende sowie antifugale Eigenschaften oder können als zytotoxische oder auch antineoplastische Wirkstoffe fungieren. Eine Besonderheit dieser natürlichen Cyclopeptide mit einer Ringgröße von 18, 21 oder 24 Ringatomen ist, dass sie alternierend aus verschiedenen natürlichen und nicht-natürlichen 5-gliedrigen, heterocyclischen Aminosäuren mit Oxazolin-, Oxazol-, Thiazolin- oder Thiazolringen aufgebaut sind, welche den Grundstrukturen Rigidität verleihen.<sup>[25]</sup> Biosynthetisch werden diese heterocyclischen Einheiten aus den Aminosäuren Serin, Threonin oder Cystein gebildet. Ein Beispiel für ein solches natürliches cyclisches Hexapeptid ist das in Abb. 11 dargestellte *Westiellamid*, welches aus Oxazolin sowie L-Valin aufgebaut ist und erstmals 1990 von Hawkins aus der Seescheide (*Lissoclinum perforatum*) isoliert werden konnte.<sup>[26]</sup> Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen sowie NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Westiellamid* eine annähernd planare,  $C_3$ -symmetrische Struktur besitzt, in der alle Stickstoffatome in das Innere des Hohlraums weisen. Die Isopropylreste des Valins nehmen eine axiale Position ein und zeigen alle in die gleiche Richtung, weg von der Ebene des Makrocyclus.

Dieses Cyclopeptid ist in der Lage, Metallkationen wie z.B. Silber(I)ionen selektiv zu koordinieren.<sup>[27]</sup> Es bildet sich ein Sandwich-Komplex aus zwei Cyclopeptiden mit vier Silber(I)ionen, in dem die Bindung eines Silber(I)ions über die Carbonylgruppen des Ringes, welche sich nach innen orientieren, erfolgt, während die anderen drei Silber(I)ionen zwischen den NH-Gruppen der beiden Cyclopeptidringe gebunden werden.

Inspiziert von den strukturellen Eigenschaften des *Westiellamid* beschäftigten sich verschiedene Gruppen mit der Modifikation dieses natürlichen Cyclopeptids.<sup>[28]</sup> Die Veränderung der Grundstruktur erfolgte dabei primär an den zu den Amidbindungen vicinalen Positionen, also den Valinresten.<sup>[29]</sup> Die Gruppe um Haberhauer hingegen verfolgte die strukturelle Veränderung der Azolringe des *Westiellamids*.<sup>[30]</sup> Neben der Einführung verschiedener Seitenketten in die aromatischen Untereinheiten wurde auch der Einbau anderer Heterocyclen, wie Imidazol, realisiert.

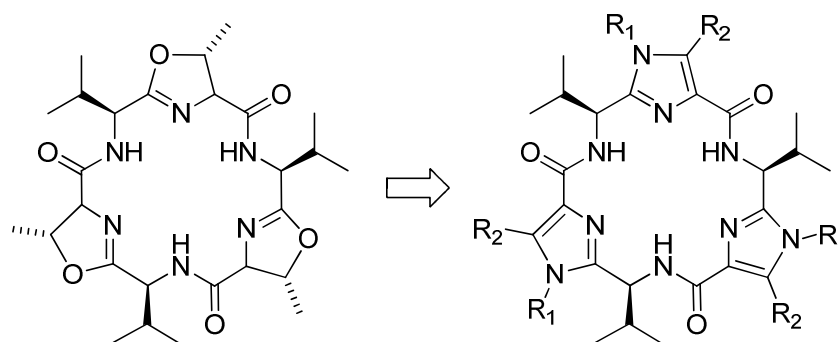


Abb. 11: *Westiellamid* (links) sowie ein von Haberhauer entwickeltes Analogon (rechts).

Durch den Einbau von Imidazolringen in die makrocyclische Grundstruktur kann der Makrocyclus nicht mehr die planare Struktur des *Westiellamids* annehmen und es kommt aufgrund einer Deformation zu einer konischen Konformation. Haberhauer nutzte in seinen Arbeiten aus, dass durch verschiedenartige strukturelle Variationen die Eigenschaften der Rezeptoren gezielt modifiziert werden können. So lassen sich neben der Ringgröße auch verschiedenste Seitengruppen an die Imidazoleinheiten des Makrocyclus anknüpfen.

Rezeptoren, die sich von den in Abb. 11 dargestellten Strukturen ableiten, aber in der Lage sind, Anionen, wie Acetat oder Phosphat, zu binden, sind in Abb. 12 gezeigt. Sie sind C<sub>2</sub>-symmetrisch und weisen im Vergleich zum *Westiellamid* deutlich mehr Wasserstoffbrückenakzeptoren auf.<sup>[31]</sup> Es zeigte sich, dass die Anionenaffinität dieser Verbindungen deutlich von der Art der beiden heterocyclischen Untereinheiten abhängt. Dies ist in Tabelle 1

verdeutlicht, in der die NMR-spektroskopisch bestimmten Bindungskonstanten verschiedener Anionenrezeptoren miteinander verglichen werden.

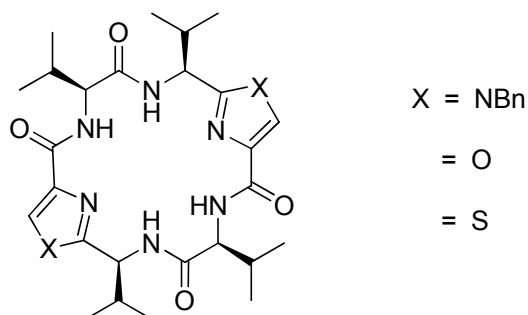


Abb. 12: Anionenrezeptoren auf Basis mariner Cyclopeptide.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, nimmt die Bindungsstärke der Komplexe mit steigendem Ionenradius des Anions ab. Darüber hinaus werden basischere Anionen stärker gebunden als weniger basische. Außerdem scheint die Anwesenheit gewinkelt zueinander stehender Wasserstoffakzeptoren im Substrat günstig.

Tabelle 1 Bindungskonstanten der 1:1-Komplexe der in Abb. 13 dargestellten Cyclopeptide mit verschiedenen Anionen in DMSO- $d_6$ /CDCl $_3$  95:5 (v/v) bei 298.1 K.

Anion	Rezeptor		
	X = NBu $K_a / M^{-1}$	X = O $K_a / M^{-1}$	X = S $K_a / M^{-1}$
H $_2$ PO $_4^-$	2640	24700	30000
AcO $^-$	270	7120	23400
F $^-$	140	820	6990
HSO $_4^-$	14	15	130
TosO $^-$	< 5	92	140
MesO $^-$	13	140	150
Cl $^-$	15	88	4010
NO $_3^-$	22	< 5	200
Br $^-$	20	16	460

Die Gruppe um Jolliffe beschäftigt sich ebenfalls mit der Entwicklung von Anionenrezeptoren auf Basis ähnlicher cyclischer Peptide. In diesem Falle dienen funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Makrocyclen, wie z.B. (Thio)Harnstoffsubstituenten oder Zn(II)-Komplexe, als Bindungsstellen für Anionen. Abb. 13 zeigt einen tripodalen Rezeptor mit (Thio)Harnstoffgruppen, der in der Lage ist, in organischen Lösungsmitteln, wie  $\text{CDCl}_3$  oder auch einem  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$  Gemisch, Sulfat selektiv mit Bindungskonstanten  $K_a > 10^4 \text{ M}^{-1}$  zu binden.<sup>[32]</sup> Die Selektivität lässt sich dabei auf die zu der tetraedrischen Geometrie des Sulfatanions komplementäre Struktur des Rezeptors zurückführen. Bei Sulfatbindung werden neun Wasserstoffbrücken zwischen den NH-Gruppen der Seitenketten und des Cyclopeptid-ringes zu den Sauerstoffatomen des Sulfatanions ausgebildet. Sphärische Anionen bilden dagegen lediglich sechs Wasserstoffbrücken zu den Harnstoff NH-Gruppen in den Seitenketten aus und werden daher schwächer gebunden. Im Vergleich zu anderen tetraedrischen Anionen, wie  $\text{HSO}_4^-$  oder  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , die in dieser Studie ebenfalls untersucht wurden, werden vollständig deprotonierte Sulfatanionen aufgrund ihrer höheren Ladung und der höheren Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren am stärksten gebunden.<sup>[33]</sup>

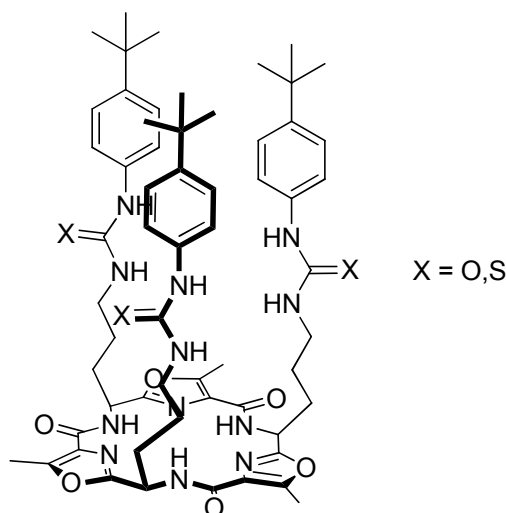


Abb. 13: Rezeptor auf Basis eines Cyclopeptids mit (Thio)Harnstoffgruppen in den Seitenketten.

Das in Abb. 14 gezeigte Cyclopeptid, welches in den Seitenketten zwei Zink(II)-Komplexe trägt, bindet Oligophosphate wie Pyrophosphat, ADP oder auch ATP.<sup>[34]</sup> Dabei hängt die Affinität hauptsächlich von der Position der Zink(II)-Komplexe im Cyclopeptidgrundgerüst sowie von dem sterischen Anspruch der anderen Seitenketten ab.<sup>[35]</sup>

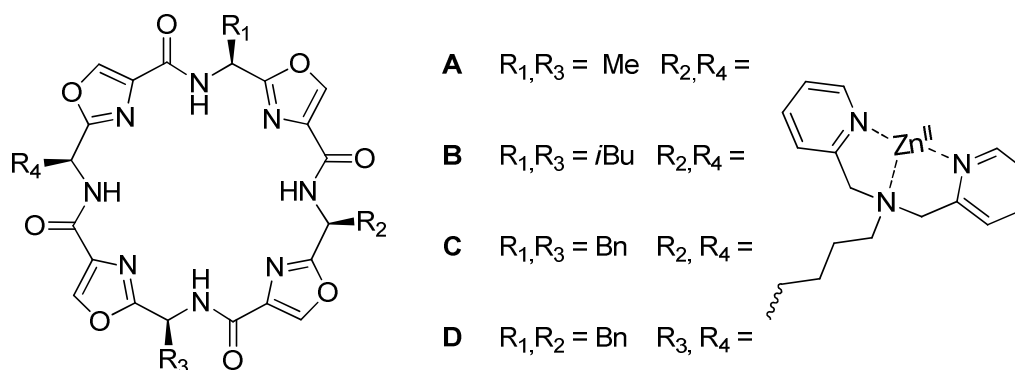


Abb. 14: Rezeptoren auf Basis eines Cyclopeptids mit Zn(II)-Komplexen.

Bindungsstudien, die mit Hilfe des sogenannten Indicator Displacement Assays in HEPES Puffer bei pH 7.4 und 25 °C durchgeführt wurden, zeigten, dass Cyclopeptid **A** mit jeweils zwei gegenüberliegenden Zink(II)-Komplexen und Methylgruppen in den verbleibenden beiden Aminosäureeinheiten die niedrigste Affinität für ATP, ADP sowie Pyrophosphat aufweist. Durch Einführen von *i*-Butyl- anstelle von Methylresten wurde das Cyclopeptid **B** erhalten und die Affinität konnte erheblich gesteigert werden, jedoch zu Lasten der Selektivität. Die höchsten Bindungskonstanten wurden für den Rezeptor **C** mit Benzylsubstituenten bestimmt. Bei Anordnung der beiden Zn(II)-Komplexe und Benzylreste jeweils in benachbarten Aminosäureeinheiten fällt zwar die Bindungsstärke leicht ab, jedoch ist der entsprechende Rezeptor **D** selektiv für Pyrophosphatanionen (Tabelle 2).<sup>[36]</sup>

Tabelle 2 Bindungskonstanten für die Rezeptoren **A** – **D** in wässriger Pufferlösung (5 mM HEPES) bei pH 7.2 und 298.1 K.

	log $K_a$		
	PPi	ADP	ATP
<b>A</b>	7.2	6.3	6.5
<b>B</b>	7.4 – 7.6	7.4 – 7.6	7.4 – 7.6
<b>C</b>	8.4	7.5	8.6
<b>D</b>	7.9	7.0	7.2

Ein Problem in der Verwendung von Cyclopeptiden als Rezeptoren liegt in deren Tendenz, in Lösungen Konformationen anzunehmen, die über intramolekulare H-Brücken stabilisiert werden, wodurch die NH- und/oder C=O Gruppen nicht für die Wechselwirkung mit dem Gastmolekül zur Verfügung stehen. Ein Beispiel für diese Eigenschaft ist in Abb. 15

dargestellt. Das cyclische Pseudohexapeptid, das aus D,L- $\alpha$ -Aminoxysäuren aufgebaut ist, nimmt in  $\text{CDCl}_3$  eine  $C_3$ -symmetrische Konformation ein, die durch Wasserstoffbrücken ober- und unterhalb der Ringebene stabilisiert wird.<sup>[37]</sup> Durch abwechselnden Einbau der D- bzw. L-Aminoxysäuren weisen die NH-Protonen jeweils in Richtung der benachbarten Carbonylgruppe und binden an diese über Wasserstoffbrücken. Die Seitenketten weisen vom Ring weg. Dieses Pseudocyclopeptid ist in der Lage, in  $\text{CDCl}_3$  Anionen, wie Halogenide, in Form von 1:1 Komplexen zu binden. Bei Anionenbindung kommt es zu einer konformativen Reorganisation des Pseudopeptids, so dass alle NH-Protonen nun in den Hohlraum zeigen, um dort das Anion zu binden. Die Bindungskonstanten für den  $\text{Cl}^-$  sowie  $\text{F}^-$ -Komplex wurden zu  $K_a = 11880 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $K_a = 30 \text{ M}^{-1}$  ermittelt. Der Hohlraum scheint also für die Bindung des Chloridanions optimal zu sein. Eine alternative Erklärung für die wesentlich schwächere Bindung des Fluoridanions könnte die starke Solvatisierung dieses Anions sein, wodurch Wasserspuren im organischen Lösungsmittel sich bevorzugt an das Anion anlagern und dadurch dessen Wechselwirkung mit dem Rezeptor schwächen.

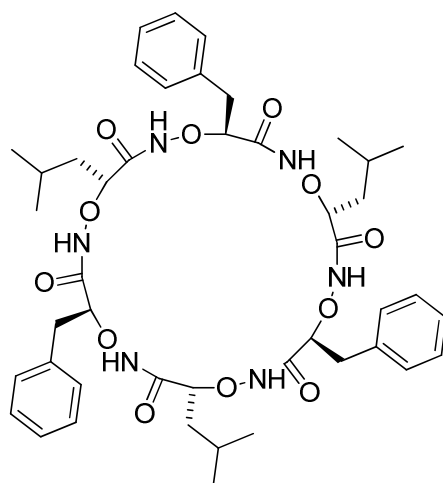
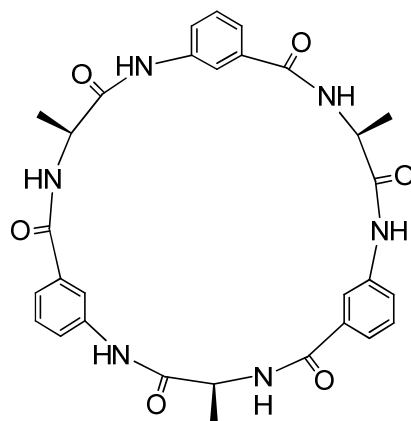


Abb. 15: Pseudocyclopeptid aus D,L- $\alpha$ -Aminoxysäuren.

Eine Strategie, die konformelle Flexibilität von Cyclopeptiden einzuschränken, besteht im Einbau von rigiden aromatischen Untereinheiten. Diese Strategie verfolgte Ishida bei der Synthese eines in alternierender Sequenz aus L-Alanin und der nicht-natürlichen aromatischen Aminosäure 3-Aminobenzoessäure aufgebauten cyclischen Hexapeptids. Dieses Cyclopeptid *cyclo*(Ala-Aba)<sub>3</sub>, welches in Abb. 16 dargestellt ist, bildet in dem kompetitiven Lösungsmittel DMSO mit *p*-Nitrophenylphosphat einen 1:1-Komplex ( $K_a = 1.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).



Abb. 16: Struktur von *cyclo*(Ala-Aba)<sub>3</sub>.

Eine Weiterentwicklung dieses Konzeptes bestand in der Verwendung von rigiderem L-Prolin anstelle der Alanineinheiten. Aufgrund der cyclischen Struktur von Prolin ist die Rotation um die peptidische N-C-Bindung nicht möglich. L-Prolin gilt in Proteinen als Strukturbrecher, da es geknickte oder gekrümmte Anordnungen in der Peptidkette induziert. Weiterhin ist Prolin aufgrund der tertiären Amide in der Peptidkette nicht in der Lage, als Protonendonor zu agieren. Eine weitere Besonderheit dieser natürlichen Aminosäure besteht darin, dass sie an den tertiären Amididen innerhalb einer Peptidkette auch die *cis*-Konformation zulässt, während die Peptidgruppen anderer Aminosäuren in einer Polypeptidkette größtenteils in der *trans*-Konformation vorliegen (siehe Abb. 17).

Abb. 17: *cis/trans*-Konformationen an sekundären und tertiären Amididen.

Cyclopeptide mit alternierenden Sequenzen von L-Prolin und aromatischen Aminosäure-untereinheiten wurden erstmals in der Gruppe von Kubik als synthetische Rezeptoren untersucht. Kristallstrukturen sowie NMR-Untersuchungen der entsprechenden Hexapeptide zeigten, dass die Amidgruppen an den Prolineinheiten in der *trans*-Konformation vorliegen, sofern es sich bei den aromatischen Aminosäureuntereinheiten um Derivate der 3-Aminobenzoessäure handelt (Abb. 18). Neben der erwünschten eingeschränkten konformativen Flexibilität dieses Rezeptors hat der Einbau von Prolineinheiten noch weitere Konsequenzen.

Das entsprechende Cyclopeptid  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$  besitzt weniger Bindungsstellen für Anionen als  $cyclo(\text{Ala-Aba})_3$ , da drei der sechs NH Gruppen wegfallen. Dieses Cyclopeptid nimmt in Lösung im zeitlichen Mittel eine Struktur an, die mit der *cone* Konformation der Calixarene vergleichbar ist. Trotz der unterschiedlichen Konstitutionen ähneln sich die beiden Rezeptoren  $cyclo(\text{Ala-Aba})_3$  und  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$  in ihrem Bindungsverhalten. Beide Rezeptoren stellen ditope Rezeptoren dar, die Kationen über Wechselwirkungen mit den aromatischen Untereinheiten und Anionen, wie Iodid oder Tosylat, über Wasserstoffbrücken an die Amid NH-Protonen binden können.<sup>[38]</sup> Dabei zeigt das Cyclopeptid  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$  etwas günstigere Bindungseigenschaften, da in Abwesenheit von koordinierenden Anionen, die an die NH-Gruppen binden, stabilere Kationenkomplexe gebildet werden als von  $cyclo(\text{Ala-Aba})_3$  und auch weniger stark koordinierende Anionen an die NH-Gruppen von  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$  binden können. Während  $cyclo(\text{Ala-Aba})_3$  z.B. nur mit Sulfonaten oder Phosphonaten wechselwirkt, bindet  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$  auch an Iodidanionen.

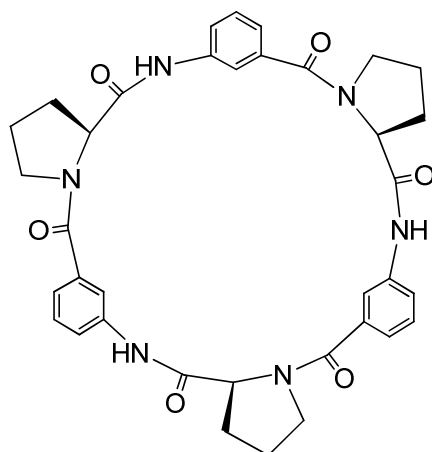


Abb. 18: Struktur von  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$ .

Eine Erhöhung der Anionenaffinität von  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$  konnte durch Austausch der Aminobenzoesäure- gegen 6-Aminopicolinsäureeinheiten erreicht werden (siehe Abb. 19). Durch Anwesenheit der Ringstickstoffatome in den aromatischen Einheiten wird eine konvergierende Anordnung der drei NH-Gruppen induziert, so dass dieses Cyclopeptid optimal für die Anionenbindung vororganisiert ist. Daneben liegen die tertiären Amidgruppen in diesem Cyclopeptid im Gegensatz zu denen in  $cyclo(\text{Pro-Aba})_3$  in der *cis*-Konformation vor. Aufgrund der sehr guten Vororganisation für die Anionenbindung stellt das cyclische Hexapeptid  $cyclo(\text{Pro-Apa})_3$  **1** (Abb. 19) einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Anionenrezeptoren dar. Eine Besonderheit von **1** ist, dass dieser Rezeptor

Anionen, wie Halogenide oder Sulfationen, auch in kompetitiven Lösungsmittelgemischen mit einem Wasseranteil von bis zu 80 % außerordentlich stark bindet. Die Bindung erfolgt dabei aufgrund der Neutralität des Rezeptors ausschließlich über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen.

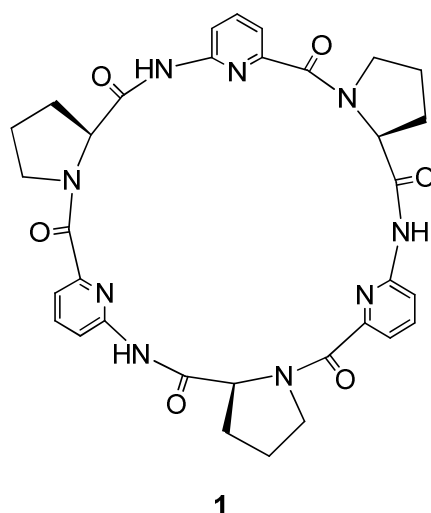


Abb. 19: Struktur von *cyclo*(Pro-Apa)<sub>3</sub> **1**.

Ein Grund für die Anionenaffinität von **1** in wässrigen Lösungsmittelgemischen ist, dass unter diesen Bedingungen Sandwich-Komplexe gebildet werden, in denen der Gast vollständig umschlossen und so vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird. Dank der guten Vororganisation des Cyclopeptids führt die Komplexbildung außerdem nicht zu einem ausgeprägten Verlust von Freiheitsgraden, was sich günstig auf die Komplexbildungsentropie auswirkt. Abb. 20 zeigt die Kristallstruktur des Komplexes aus **1** und einem Iodidanion. Man erkennt, dass das Anion über sechs Wasserstoffbrücken zu den NH-Gruppen der beiden Cyclopeptidringe gebunden wird, welche in den Hohlraum in Richtung des Gastes ragen. Zusätzlich deutet die räumliche Nähe der Prolinuntereinheiten beider Cyclopeptidringe an, dass hydrophobe Wechselwirkungen die Komplexbildung in Wasser begünstigen.

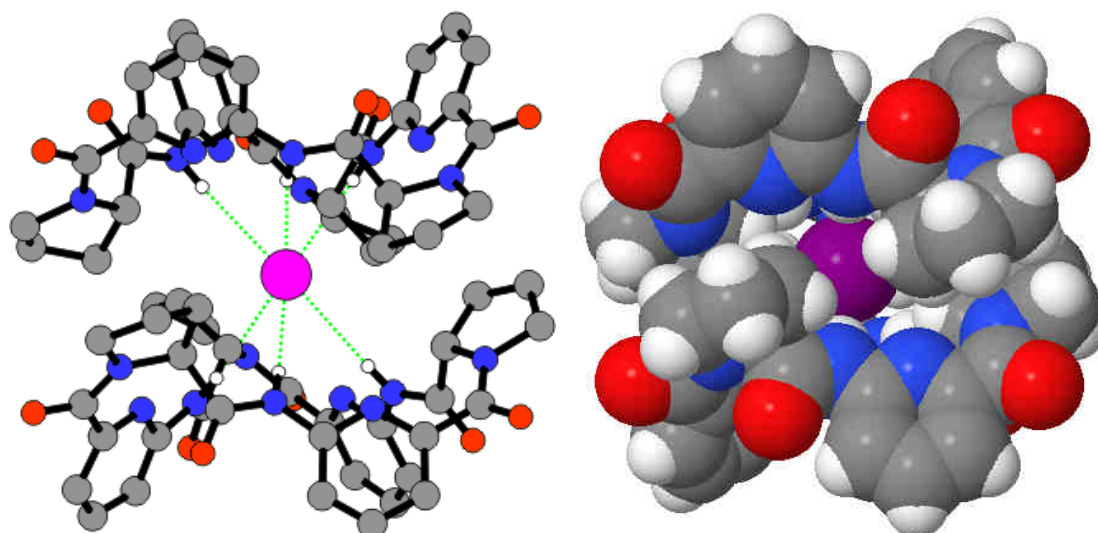


Abb. 20: Kristallstruktur des Sandwich-Komplexes aus zwei Molekülen von **1** und einem Iodidanion.

### 2.2 Aufgabenstellung

Die bisher in der Arbeitsgruppe Kubik untersuchten Cyclopeptide waren zumeist in Gemischen aus organischen Lösungsmitteln und Wasser aber nie in 100 % Wasser löslich. Durch Einführung von hydrophilen Substituenten in der Peripherie des Cyclopeptids könnte die Wasserlöslichkeit erhöht werden. Betrachtet man die Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **1** (Abb. 20), so lässt sich erkennen, dass in erster Linie die C( $\gamma$ )-Atome der Prolinuntereinheiten geeignete Positionen für das Anbringen zusätzlicher Substituenten darstellen. An anderen Positionen innerhalb der Prolinringe ist mit massiven Einflüssen auf die bevorzugte sandwich-artige Anordnung der Cyclopeptidringe in den Anionenkomplexen zu rechnen. Vorteilhaft ist, dass eine regioselektive Modifizierung von Prolinuntereinheiten leicht durch Verwendung von natürlichem L-Hydroxyprolin als Ausgangsmaterial möglich ist. Durch die Konfiguration der C( $\gamma$ ) Position in den Prolinringen kann man steuern, ob die Substituenten in entsprechenden Derivaten von Cyclopeptid **1** divergieren und dadurch maßgeblich nur die Löslichkeit beeinflussen oder in Richtung der Bindungsstelle des Cyclopeptids konvergieren. Im zweiten Fall könnten sie sich an der Anionenbindung beteiligen, was besonders interessant wäre. Konvergierende Substituenten resultieren bei 4*R*-konfigurierten 4-substituierten Prolinuntereinheiten. Auf Basis dieser Überlegungen wurde

das substituierte Cyclopeptid **2** konzipiert, dessen endständige Ammoniumgruppen für die Wasserlöslichkeit sorgen sollten (Abb. 21).

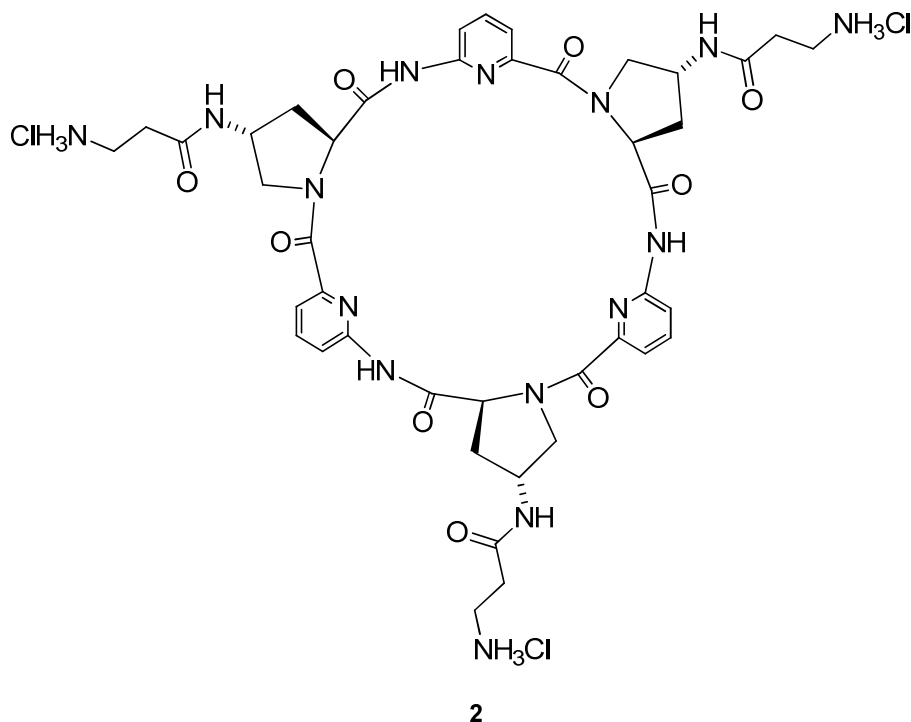


Abb. 21: Zielstruktur **2**·3HCl.

Die gewählten Cyclopeptidsubstituenten leiten sich von  $\beta$ -Alanin ab, um den Seitenketten eine gewisse Flexibilität zu verleihen. Dadurch sollte erreicht werden, dass sich die endständigen Ammoniumgruppen an der Wechselwirkung von **2** mit Anionen sowohl über elektrostatische Wechselwirkungen als auch gegebenenfalls über gerichtete Wasserstoffbrücken beteiligen können (Abb. 22).

Die Struktur des Sulfatkomplexes von **2** wurde mit Hilfe von Molecular Modelling Studien berechnet. Diese Berechnungen wurden mit Mac Spartan 10 (Wavefunction Inc.) unter Verwendung des MMFF Kraftfelds ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelmolekülen durchgeführt. Die erhaltene Struktur des Komplexes ist in Abb. 22 abgebildet. Darin ist das Sulfatanion in der Nähe der typischen Bindungsstelle des Cyclopeptidringes angeordnet und bindet drei seiner Sauerstoffatome über Wasserstoffbrücken an die NH-Gruppen im Ring. Die  $\beta$ -Alaninseitenketten umschließen das Gastmolekül und schirmen es vom umgebenden Lösungsmittel ab. Alle drei Ammoniumgruppen der Seitenketten binden an das vierte Sauerstoffatom des eingelagerten Anions. Darüber hinaus sind intramolekulare Wasserstoffbrücken

zwischen den Seitenketten sichtbar, die die Komplexstruktur zusätzlich stabilisieren. Insgesamt weist der gebildete 1:1 Komplex eine annähernd perfekte  $C_3$ -Symmetrie auf.

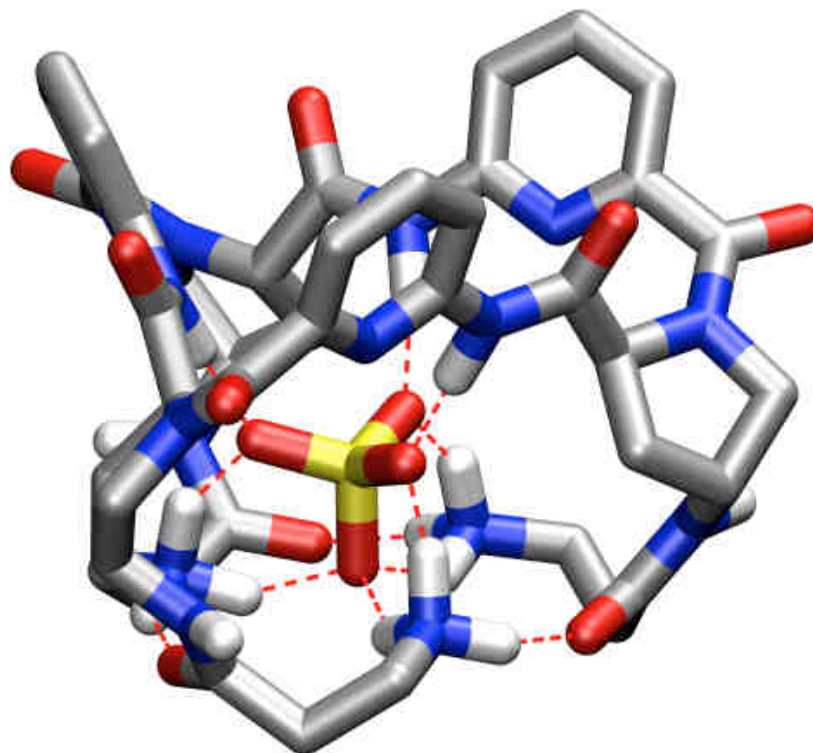


Abb. 22: Ergebnis einer Molecular Modelling Studie zur Struktur des Sulfat- Komplexes von **2**·3HCl. Intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken sind als rote gestrichelte Linien dargestellt (Mac Spartan 10, Wavefunction Inc., MMFF Kraftfeld ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelmolekülen).

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Synthese

Cyclopeptid **2** kann aus Cyclopeptid **3** durch Anknüpfen von  $\beta$ -Alaninsubstituenten erhalten werden. Verbindung **3** wurde bisher im Arbeitskreis aus dem entsprechenden Z-geschützten Derivat **4** synthetisiert. Eine alternative Vorstufe von **3** ist das Triazid **5** (Abb. 23). Dieses Cyclopeptid wurde bisher in unserem Arbeitskreis noch nicht synthetisiert. Ein Vergleich der beiden Synthesestrategien insbesondere in Bezug auf die Anzahl der durchzuführenden Umsetzungen zeigt, dass aufgrund der geringeren Zahl an Syntheseschritten, **5** die attraktivere Vorstufe für **3** wäre. Ich habe mich daher mit der Synthese von **5** beschäftigt.

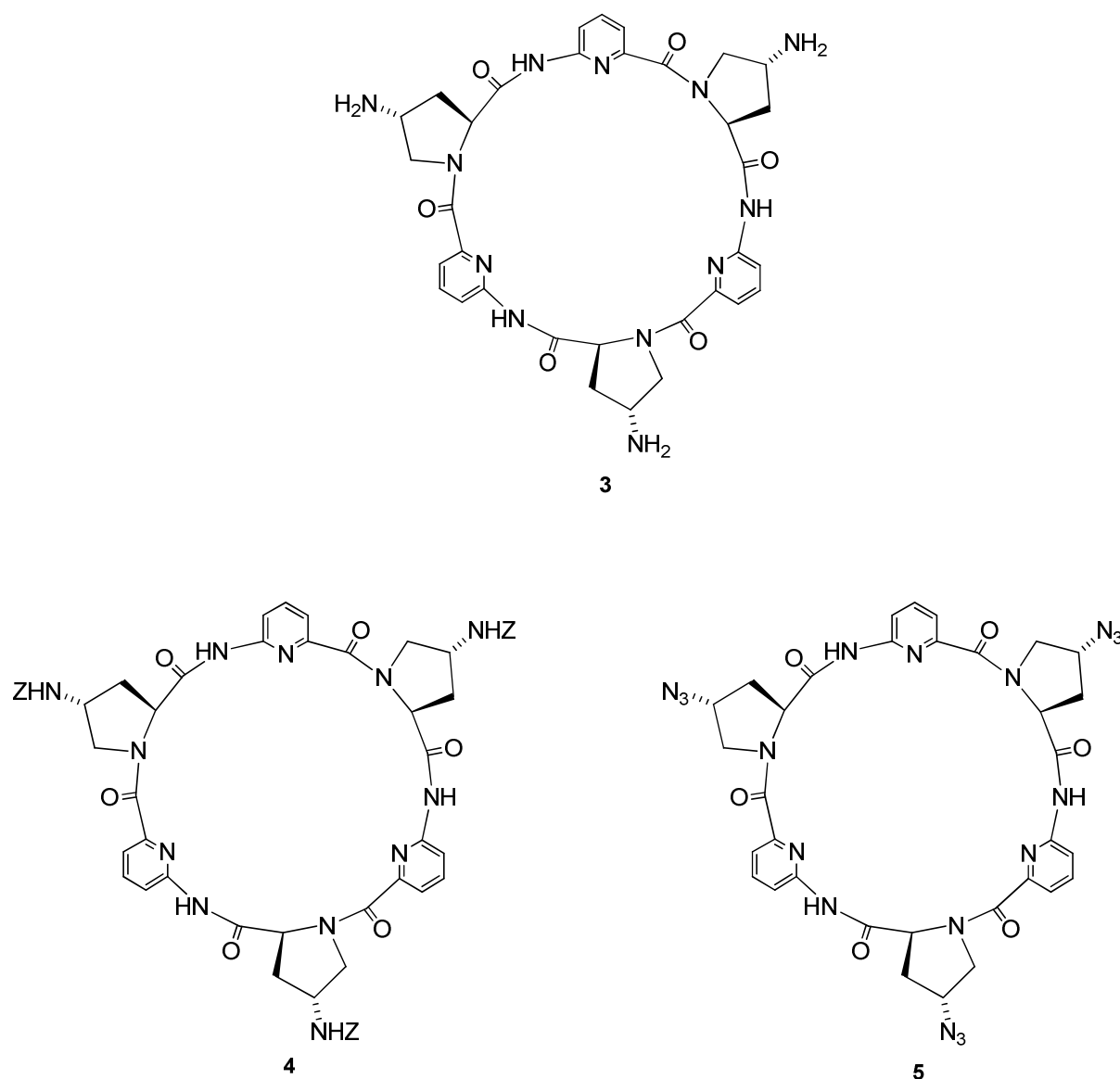


Abb. 23: Strukturen der Cyclopeptide **3**, **4** und **5**.

Arbeiten von M. Zengerle im Rahmen seiner Diplomarbeit zur Synthese eines entsprechenden Cyclopeptids mit 4*S*-konfigurierten 4-Azidoprolinuntereinheiten verliefen nicht erfolgreich, so dass im Rahmen dieser Arbeiten eine sorgfältige Überprüfung und Verbesserung der einzelnen Syntheseschritte durchgeführt werden sollte.<sup>[39]</sup>

Die sich wiederholende Komponente, aus der das Cyclopeptid aufgebaut ist, ist das in Abb. 24 dargestellte Dipeptid. Die Wahl der Schutzgruppen ist für die Synthese von **5** von essentieller Bedeutung.

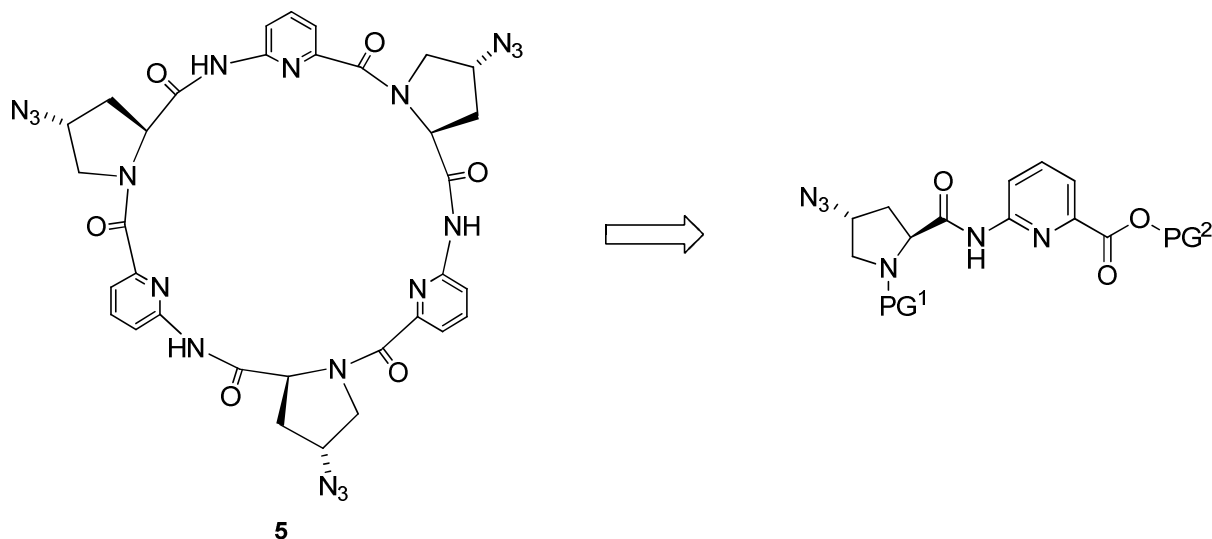


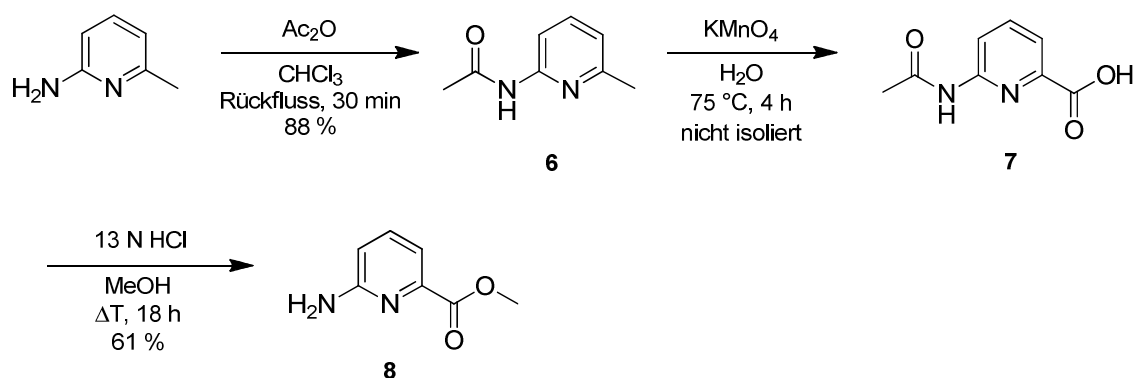
Abb. 24: Baustein für die Synthese des Cyclopeptids **5**.

Als Schutzgruppen für die terminalen Aminogruppen wird in den in der Arbeitsgruppe durchgeführten Peptidsynthesen üblicherweise die Boc-Gruppe verwendet. Diese Schutzgruppe wird unter trockenen sauren Bedingungen abgespalten. Azidgruppen sind unter diesen Bedingungen stabil. Darum sollte für den Aufbau von **5** die Boc-Schutzgruppen an den Aminogruppen beibehalten werden. Als Schutzgruppen für Carboxylatgruppen haben sich in unseren Peptidsynthesen Benzylester, Allylester und in jüngerer Zeit auch Methylester bewährt. Benzylester kommen für den Aufbau von **5** nicht in Frage, da sie hydrogenolytisch unter Bedingungen gespalten werden, unter denen Azidgruppen zu Aminen reduziert werden. Die Abspaltung der Allylester erfolgt üblicherweise katalytisch mit  $[Pd(PPh_3)_4]$ . Das im Katalysator enthaltene Triphenylphosphin, welches als Ligand fungiert, könnte im Sinne einer Staudinger Reaktion nucleophil an Azidgruppen angreifen, so dass mit Nebenreaktionen zu rechnen ist. Außerdem ist die Palladium(0)-katalysierte Spaltung von Allylestern etwas aufwendiger als die Spaltung von Methylestern und die Darstellung von 6-Aminopicolinsäureallylester stufenreicher und mit niedrigeren Ausbeuten verbunden als die Synthese von 6-Aminopicolinsäuremethylester. Darum wurde die Kombination Boc-Gruppe für die terminale Aminogruppe und Methylester für die Carboxylatgruppe als Schutzgruppenstrategie für die Synthese von **5** gewählt.



Die Aminosäurekomponenten für die Synthese des benötigten Dipeptids wurden zunächst unabhängig voneinander dargestellt.

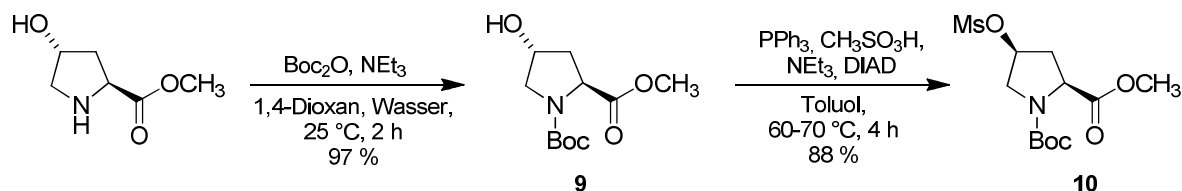
6-Aminopicolinsäuremethylester wurde gemäß Schema 1 in einer dreistufigen Synthese aus 6-Aminopicolin generiert. Hierzu wurde das Edukt zunächst an der Aminofunktion mit einer Acetylgruppe geschützt. Dann wurde die Methylgruppe mit Kaliumpermanganat zur Säure oxidiert. Schließlich wurde die erhaltene *N*-Acetyl-6-aminopicolinsäure mit einer methanolischen HCl-Lösung behandelt. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Veresterung der Carbonsäure unter gleichzeitiger Abspaltung der *N*-Acetylschutzgruppe zum gewünschten Produkt **8**.<sup>[40]</sup>



Schema 1 Synthese des 6-Aminopicolinsäuremethylesters **8**.

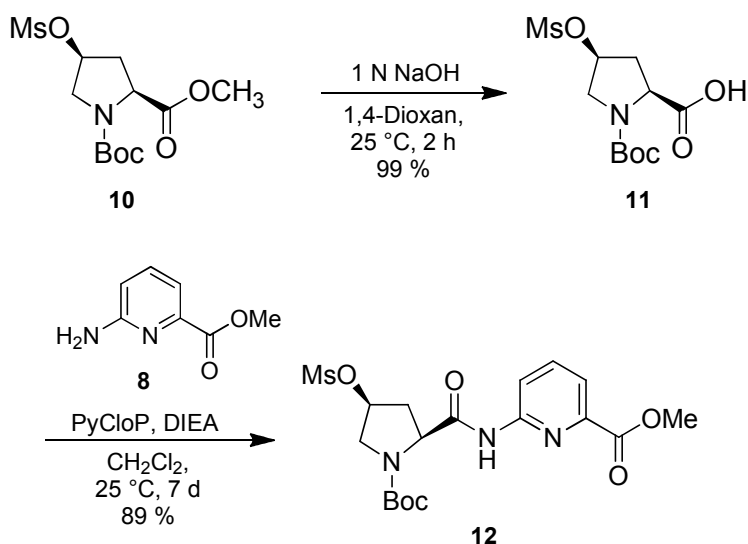
Für die Synthese des Prolinderivats wurde zunächst der kommerziell erhältliche 4*R*-Hydroxy-L-prolinmethylester Boc-geschützt. Dann wurde die Hydroxygruppe des Hydroxyprolins in einer Mitsunobu-Reaktion<sup>[41]</sup> nach einer Vorschrift von Malley und Gougoutas unter Inversion des Stereozentrums am C( $\gamma$ )-Atom mit Methansulfonsäure zum *N*-Boc-4*S*-Mesyloxy-L-prolinmethylester **10** umgesetzt.<sup>[42]</sup> Die Reaktionsfolge ist in

Schema 2 abgebildet.



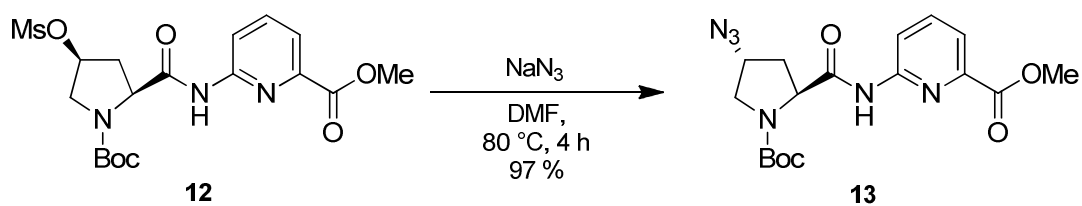
Schema 2 Darstellung von *N*-Boc-4*S*-Mesyloxy-L-prolinmethylester **10**.

Für die Darstellung des Dipeptids, das für die Synthese von **5** benötigt wurde, wurde **10** zunächst mit 1.5 equiv Natriumhydroxid verseift. Anschließend wurde das erhaltene *N*-Boc-4*S*-Mesyloxy-L-prolin **11** mit 6-Aminopicolinmethylester **8** in Gegenwart von PyCloP zum Dipeptid gekuppelt (Schema 3).



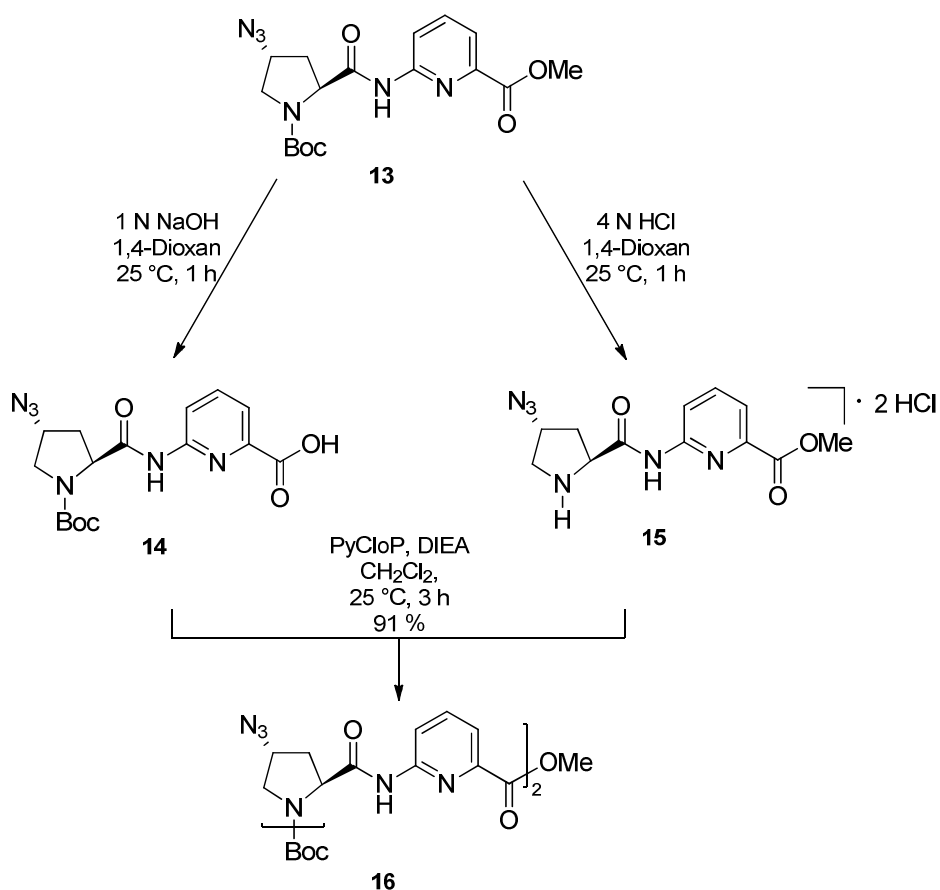
Schema 3 Synthese des Dipeptids *N*-Boc-4*S*-(Mesyloxy)Pro-Apa-OMe **12**.

Zuletzt wurde die Mesyloxy-Gruppe in **12** durch Umsetzung mit Natriumazid in eine Azidgruppe überführt (Schema 4). Dabei erfolgte eine erneute Inversion des Stereozentrums am C( $\gamma$ )-Atom.



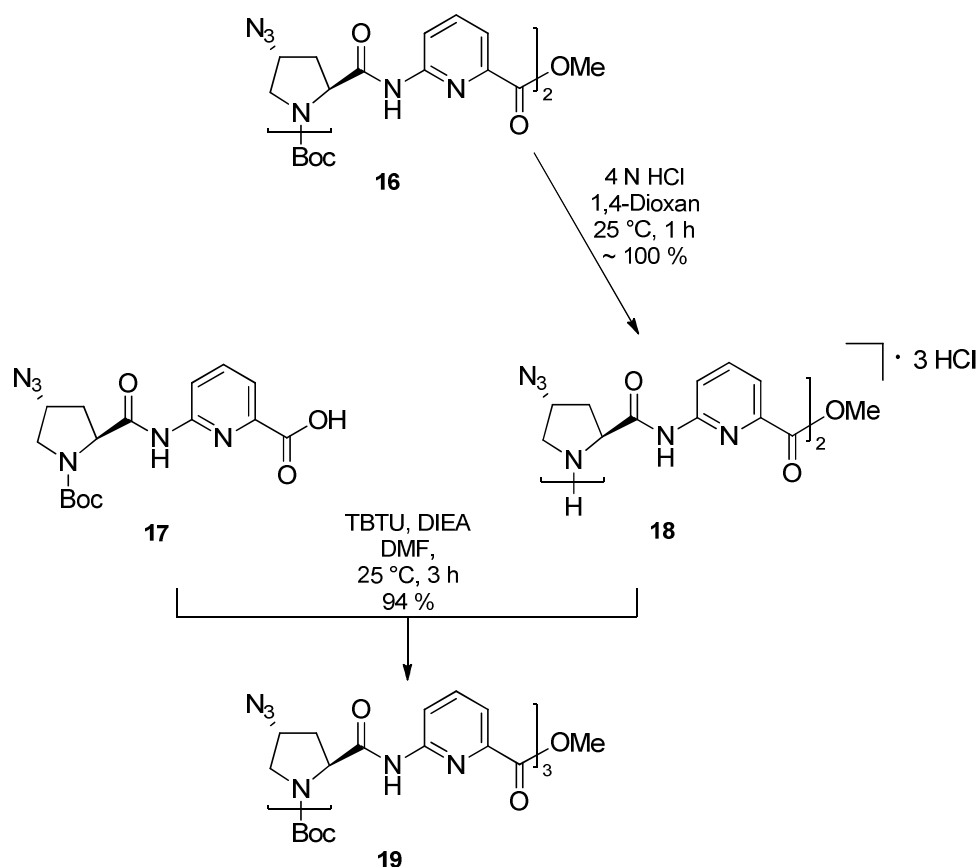
Schema 4 Darstellung des Azids **13**.

Ausgehend von diesem Dipeptid konnte das Cyclopeptid nun sequentiell aufgebaut werden. Hierfür wurde **13** in drei Portionen aufgeteilt. Ein Teil der Verbindung wurde Boc-entschützt und ein zweiter einer basischen Hydrolyse zur Spaltung des Methylesters unterworfen. Die beiden entschützten Dipeptide wurden nun mit PyCloP zum entsprechenden Tetrapeptid **16** gekuppelt.



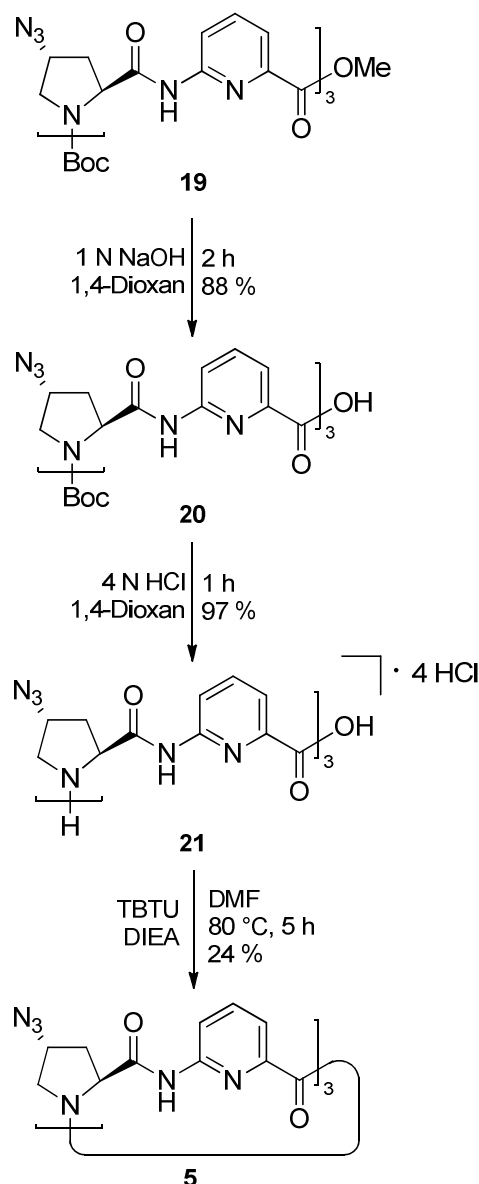
Schema 5 Synthese des Tetrapeptids Boc-[(Azido)Pro-Apa]<sub>2</sub>-OMe **16**.

Das Tetrapeptid **16** wurde nun am N-Terminus entschützt und mit der dritten Portion von **13**, welche zuvor am C-Terminus entschützt wurde, umgesetzt. Die Kupplung erfolgte in DMF unter Verwendung von TBTU als Kupplungsreagenz. Die Aufarbeitung wurde säulen-chromatographisch durchgeführt.



Schema 6 Synthese des Hexapeptids Boc-[(Azido)Pro-Apa]<sub>3</sub>-OMe **19**.

Für die Cyclisierung wurde **19** zunächst am C-Terminus entschützt und dann die Boc-Schutzgruppe abgespalten. Das vollständig entschützte Hexapeptid **21**, welches als Hydrochloridsalz erhalten wurde, wurde anschließend unter Pseudohochverdünnung unter Verwendung von TBTU als Kupplungsreagenz und erhöhter Temperatur zum Cyclopeptid cyclisiert (Schema 7). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung und Umfällen in Diethylether betrug die Ausbeute an **5** 24 %, was im Vergleich zu anderen Peptidsynthesen eher gering ist.



Schema 7      Synthese des Cyclohexapeptids **5**.

Durch Analyse des erhaltenen Produkts mittels  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie sowie analytischer HPLC wurden Verunreinigungen in dem Cyclopeptid **5** nachgewiesen, die sich auf herkömmliche Weise nicht vollständig abtrennen ließen. Da das Nebenprodukt einen ähnlichen Retentionsfaktor aufwies wie **5**, war eine chromatographische Aufreinigung des Produktes nicht erfolgreich. Auch eine Umkristallisation schlug fehl. Aufgrund dieser Schwierigkeiten und der relativ niedrigen Ausbeute im Cyclisierungsschritt wurde diese Synthesestrategie verworfen und Cyclopeptid **2** musste auf anderem Weg synthetisiert werden.

Alternativen für die Synthese von **2** bestehen darin, die  $\beta$ -Alaningruppen in das bekannte Cyclopeptidtriamin **3** einzuführen oder **2** ausgehend von einem bereits mit dem entsprechenden  $\beta$ -Alaninsubstituenten versehenen Dipeptid aufzubauen. Der Vorteil der ersten Synthesestrategie besteht in ihrer Modularität, d.h. ausgehend von einem zentralen Cyclopeptidbaustein sind verschiedene substituierte Cyclopeptidderivate zugänglich. Allerdings zeigte S. Stüwe in ihrer Dissertation, dass diese Strategie nachteilig ist, wenn die dreifache Funktionalisierung der Cyclopeptidtriaminvorstufe nicht ausreichend effizient verläuft.<sup>[43]</sup> In diesem Fall ist die Verwendung bereits funktionalisierter Dipeptidderivate für den Aufbau substituerter Cyclopeptide günstiger. Aus diesem Grunde habe ich mich entschieden, für den Aufbau von **2** zunächst die von S. Stüwe favorisierte Synthesestrategie zu verwenden, analog zu einem in der Doktorarbeit von S. Stüwe beschriebenen Cyclopeptid mit  $\alpha$ -Alaninseitenketten. Als primäres Syntheseziel sollte zunächst das in Abb. 25 dargestellte Z-geschützte Derivat von **2**, Cyclopeptid **20**, hergestellt werden.

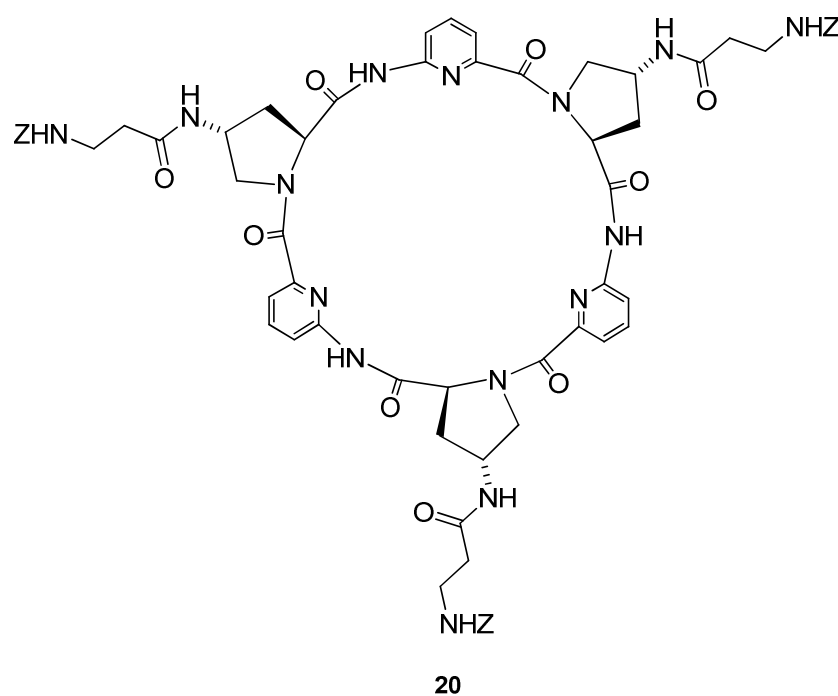
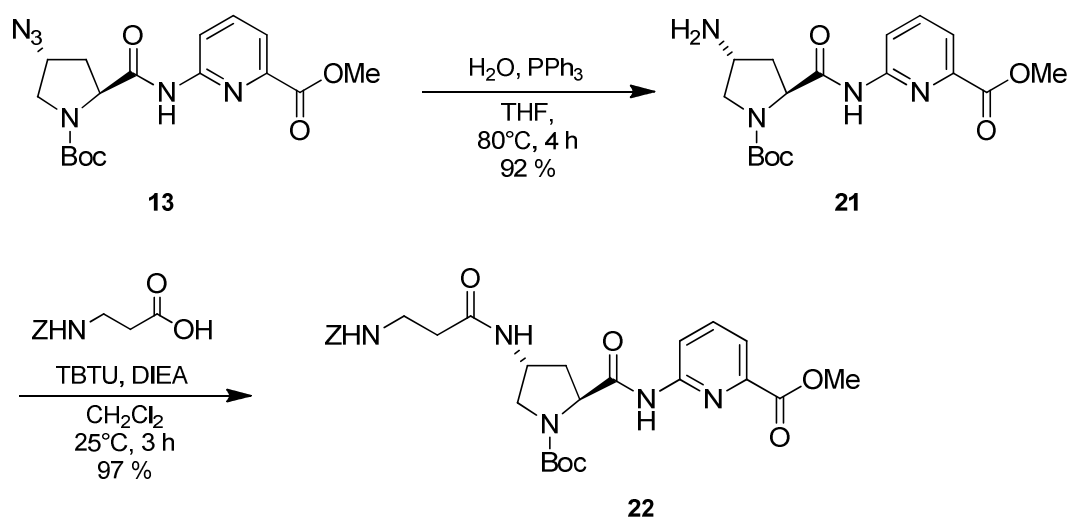


Abb. 25: Z-geschützte Vorstufe von **2**, Cyclopeptid **20**.

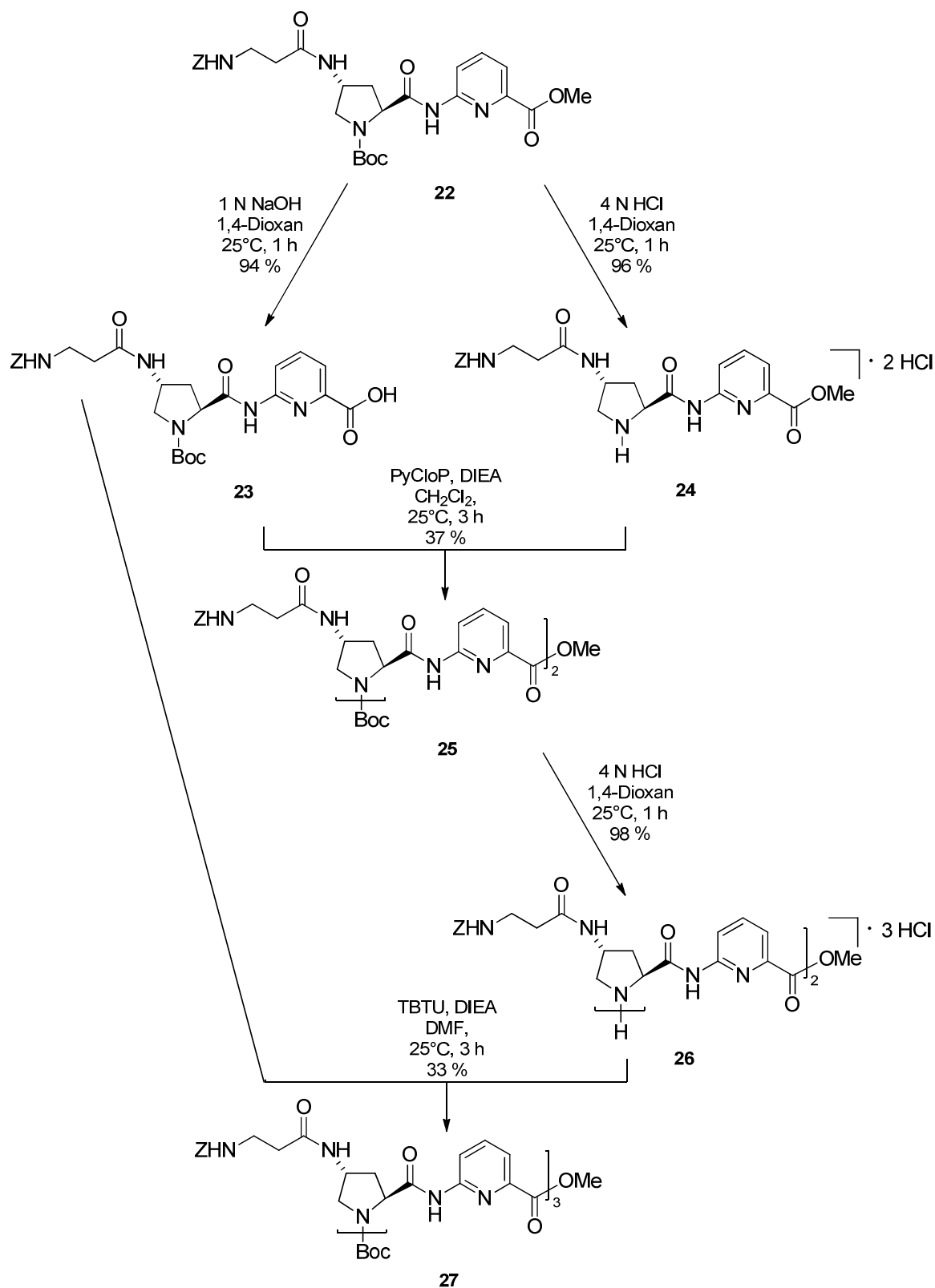
Das für die Synthese von **20** benötigte Dipeptid **22** wurde aus **13** in zwei Schritten hergestellt.



Schema 8      Synthese des substituierten Dipeptids **22**.

Zunächst wurde das Azid **13** mit Hilfe der Staudinger Reaktion zum Amin **21** reduziert. Alternativ wäre in diesem Fall die Pd-katalysierte Reduktion mit Wasserstoff möglich gewesen, die allerdings mit etwas schlechteren Ausbeuten verlief. Die Kupplung des Z-geschützten  $\beta$ -Alanins an **21** erfolgte unter Verwendung von TBTU als Kupplungsreagenz. Bei der Aufarbeitung von **22** bereitete die Abtrennung des aus TBTU entstandenen Tetramethylharnstoffs Probleme, da dieses Nebenprodukt chromatographisch ähnliche Laufeigenschaften besitzt wie das Produkt. Die Reinigung konnte aber durch wässrige Extraktion erzielt werden.

Aus dem analysenreinen Dipeptid **22** sollte das Cyclopeptid weiter wie gewohnt aufgebaut werden. Zunächst wurde nach Aufteilung des vorhandenen Materials jeweils eine Portion von **22** an der Aminogruppe und eine zweite an der Carboxygruppe entschützt, was problemlos gelang. Die anschließende Kupplung zum Tetrapeptid **25** lieferte aber überraschenderweise geringe Ausbeuten von lediglich 37 %. Die Synthese wurde dessen ungeachtet gemäß Schema 9 fortgesetzt. Das Hexapeptid konnte jedoch auch nur in geringen Ausbeuten erhalten werden. Diese Ergebnisse deuteten auf prinzipielle Probleme in den Kupplungsreaktionen hin.



Schema 9      Synthese des Hexapeptids Boc[(Z-β-Ala)Apro-Apa]<sub>3</sub>-OMe **27**.



Als Nebenprodukt wurden in den Reaktionsmischungen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie Verbindungen identifiziert, die drei Dipeptiduntereinheiten aber nur zwei Z-Schutzgruppen enthielten. <sup>1</sup>H-NMR Spektren wiesen darauf hin, dass diese Nebenprodukte z.B. die in Abb. 26 dargestellte Struktur der Verbindung **28** haben könnten. Scheinbar ist es also während der Reaktion zu einer teilweisen Abspaltung einer Z-Schutzgruppe gekommen und das so freigesetzte Amin hat mit einem C-terminal entschützten Dipeptid reagiert.

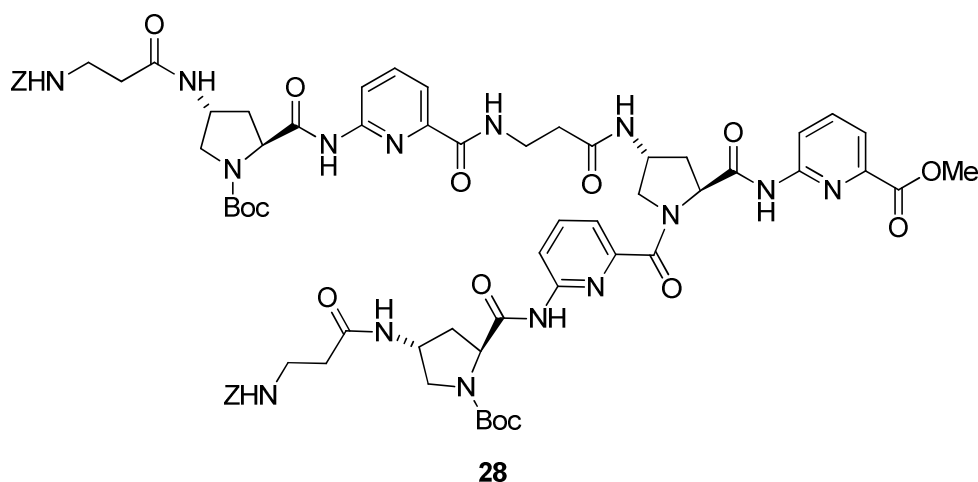
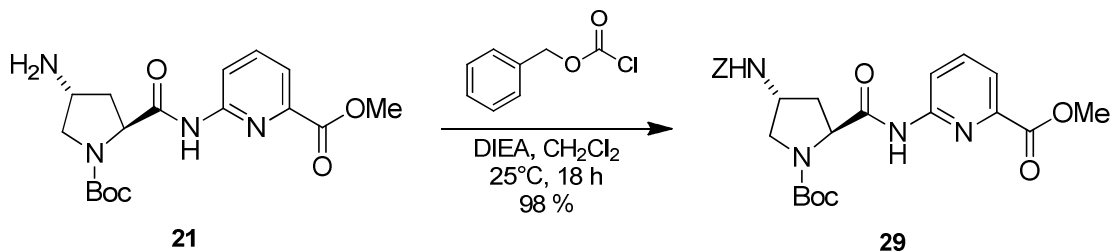


Abb. 26: Nebenprodukt, das während der Kupplung gebildet wurde.

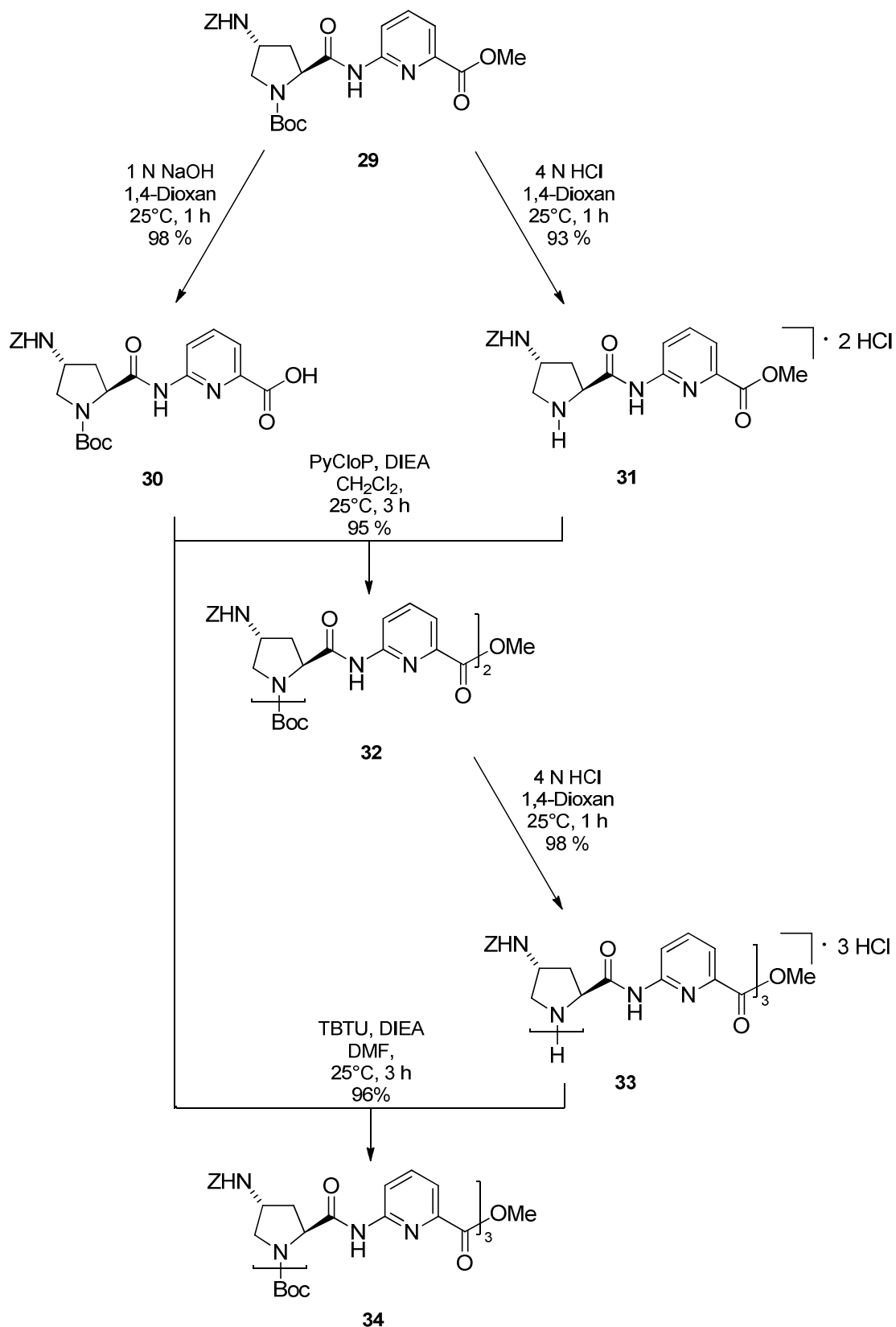
Systematische Untersuchungen zeigten, dass diese Abspaltung der Z-Schutzgruppe nicht während der Boc-Entschützung bzw. der Hydrolyse des Methylesters von **22** auftritt. Bei Rühren des Boc-entschützten Dipeptids **24** in Dichlormethan in Gegenwart von DIEA wurde jedoch die Bildung eines Z-entschützten Produkts beobachtet. Dieses fiel als weißer Feststoff aus der Reaktionslösung aus und konnte nach Abfiltrieren über das zugehörige <sup>1</sup>H-NMR Spektrum sowie mittels MALDI Massenspektrometrie charakterisiert werden. Aus diesem Experiment wurde geschlossen, dass eine intramolekulare Reaktion zwischen der Prolin NH Gruppe und dem Benzylcarbammat für die Zersetzung von **24** verantwortlich ist. Bei einem analogen Dipeptid mit einer Z-geschützten α-AlaninGruppe in der Seitenkette wurde diese Reaktion nicht beobachtet.<sup>[43]</sup> Auch wenn der genaue Mechanismus der Zersetzung von **24** noch ungeklärt ist, zeigten diese Ergebnisse, dass der Aufbau von **2** über bereits funktionalisierte Dipeptide nicht möglich ist.

Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die zweite Synthesestrategie verfolgt, bei der die Seitenkette erst in das Cyclopeptidtriamin **3** eingeführt wird. Cyclopeptid **3** wurde nach bekannten Verfahren aus dem entsprechenden dreifach Z-geschützten Derivat **4** dargestellt. Zunächst wurde hierfür das Amin **21** Z-geschützt (Schema 8).



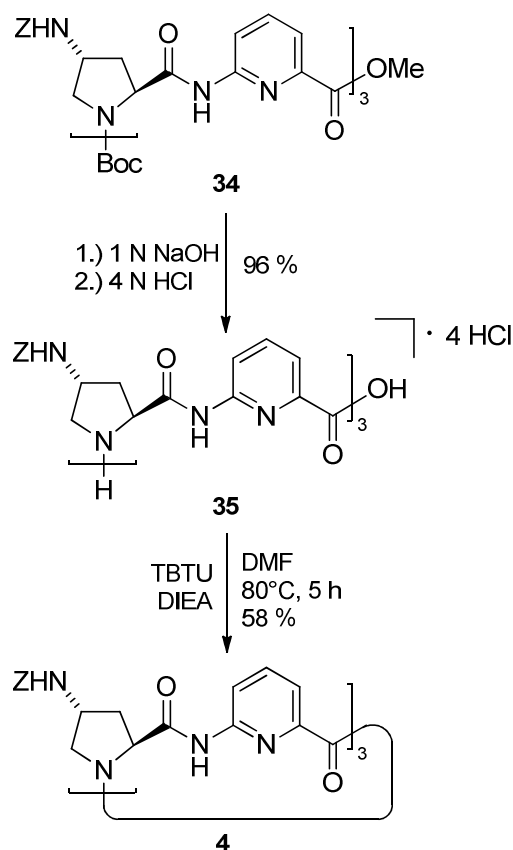
Schema 10 Schützungen der freien Aminogruppe des Dipeptids **21**.

Mit dem erhaltenen Dipeptid **29** wurde nun sequentiell das Cyclopeptid **4** aufgebaut. Dazu wurde ein Teil des Dipeptids am N-Terminus und ein weiterer Teil am C-Terminus entschützt. Die Produkte wurden dann zum Tetrapeptid **32** umgesetzt. Nach der Boc-Entschützung von **32** und Kupplung mit der freien Säure **30**, konnte das Hexapeptid **34** erhalten werden (Schema 11).



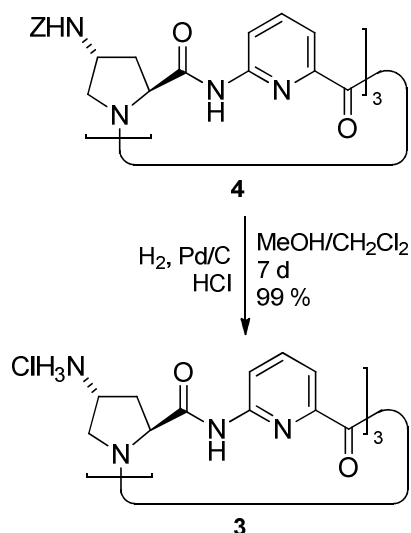
Schema 11 Darstellung des Hexapeptids **34**.

Analog zur Synthese des Cyclopeptids **5** wurde nun zunächst der Methylester in **34** durch Verseifen gespalten und anschließend die terminale Aminogruppe durch Boc-Entschützung freigesetzt. Aus dem vollständig entschützten Hexapeptid **35** konnte schließlich das Cyclopeptid **4** hergestellt werden (Schema 12).



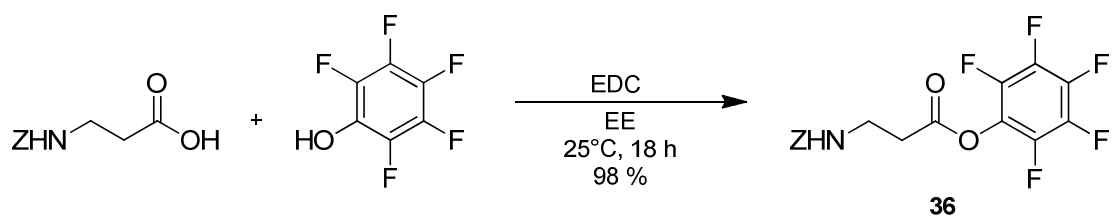
Schema 12 Darstellung des Cyclopeptids **4**.

Für die Synthese von **3** musste **4** im nächsten Schritt von den Z-Schutzgruppen befreit werden, was hydrogenolytisch mit Hilfe von Palladium auf Aktivkohle erfolgte. Die Entschützung wurde in Anwesenheit von Salzsäure durchgeführt, so dass **3** als entsprechendes Hydrochloridsalz isoliert wurde, wodurch eine größere Stabilität des Produkts gewährleistet wurde (Schema 13).



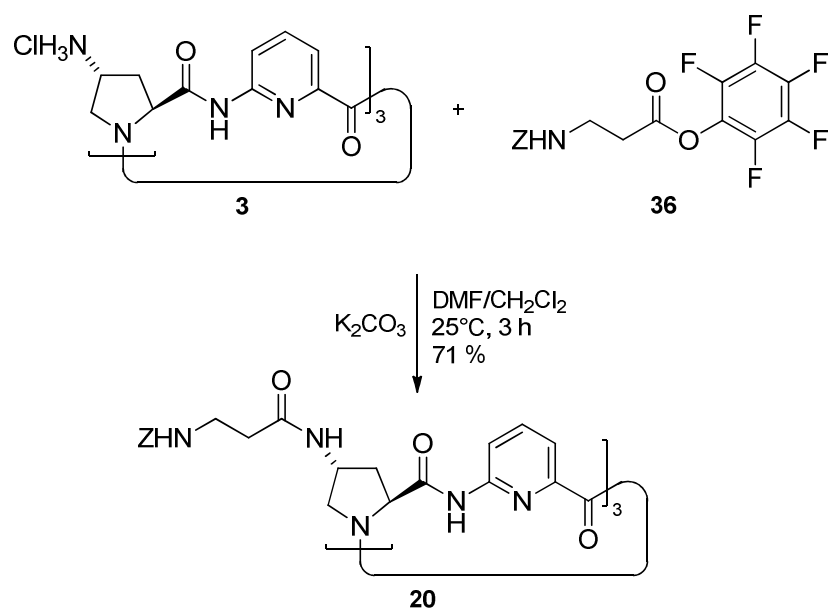
Schema 13 Entschützung des Cyclopeptidtriamins **3**.

Nun erfolgte die Kupplung der  $\beta$ -Alaninreste an **3**. Dazu wurde Z-geschütztes  $\beta$ -Alanin zunächst in den entsprechenden Pentafluorphenolester **36** überführt (Schema 14).<sup>[44]</sup>



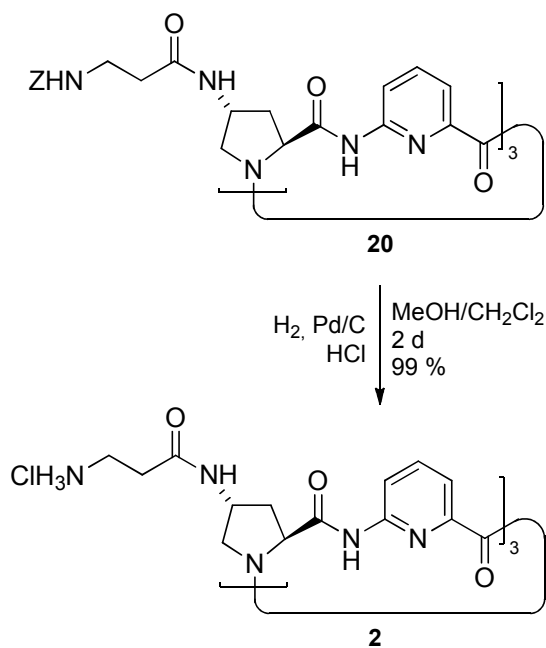
Schema 14 Umsetzung von Z-geschütztem  $\beta$ -Alanin zum Aktivester **36**.

Vorteil der Verwendung von **36** zur Darstellung von **20** ist, dass auf den Einsatz von Kupplungsreagenzien verzichtet werden kann und als Nebenprodukte nur das leicht abtrennbare Pentafluorphenol und Salze anfallen. Der Aktivester **36** wurde nun im nächsten Schritt mit dem Cyclopeptidtriamin **3** in Anwesenheit von Kaliumcarbonat als Base umgesetzt (Schema 15).



Schema 15 Darstellung des Cyclopeptids mit den Z-geschützten  $\beta$ -Alaninseitenketten **20**.

Abschließend wurden noch die Z-Schutzgruppen in den Seitenketten abgespalten. Wie bereits bei dem Aminoprolin-haltigen Cyclopeptid **3** erfolgte die Entschützung ebenfalls mit Hilfe eines Pd-Katalysators unter einer Wasserstoffatmosphäre. Auch hier wurde Salzsäure zugesetzt, um das Produkt als Hydrochloridsalz zu erhalten. Die Umsetzung erfolgte mit quantitativer Ausbeute.



Schema 16 Entschützung der Seitenketten in **20** zum Cyclopeptid **2**·3HCl.

Das so erfolgreich hergestellte Cyclopeptid **2**·3HCl wurde nun bezüglich seiner Bindungseigenschaften untersucht, wobei besonderer Augenmerk auf die Komplexierung von Anionen in Wasser gerichtet wurde. Daneben diente **2** als Ausgangsverbindung zur Herstellung komplexerer Molekülarchitekturen durch Umsetzung mit geeigneten Di- oder Trialdehyden (Kapitel 4).

### 2.3.2 Bindungsstudien

Aufgrund der drei Ammoniumfunktionen ist Cyclopeptid **2**·3HCl wasserlöslich. Es handelt sich also bei **2**·3HCl um eines der wenigen im Arbeitskreis bisher untersuchten Cyclopeptide, deren Anionenbindung in reinem Wasser untersucht werden kann. Angesichts der pH-Wert Abhängigkeit des Protonierungsgrads von **2** wurden diese Studien in gepufferten Lösungen durchgeführt. In diesem Zusammenhang war es wichtig zu sehen, ob und inwiefern die Anionenaffinität von **2** durch die in größerem Überschuss vorhandenen Puffersalze beeinflusst wird.

#### *Massenspektrometrische Analysen*

Eine erste qualitative Charakterisierung der Wechselwirkung von **2** mit verschiedenen Anionen wurde massenspektrometrisch mit Hilfe der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt. Diese relativ milde Methode der Ionisation gestattet auch die massenspektrometrische Analysen von nicht kovalent aufgebauten Aggregaten.<sup>[45]</sup> Da diese Untersuchungen in der Gasphase durchgeführt werden, sind die beobachteten Bindungseigenschaften nicht unbedingt auf das Verhalten eines Rezeptors in Lösung übertragbar. Sie geben aber qualitative Informationen über die Art der gebundenen Substrate und die Stöchiometrie der gebildeten Komplexe. Die beobachteten Ladungszustände der untersuchten Spezies hängen von der eigenen Ladung des Rezeptors und der Ladung eines gebundenen Gastes ab. Im Falle von **2**·3HCl handelt es sich um einen dreifach positiv geladenen Rezeptor, dessen Ladung teilweise von gebundenen Anionen kompensiert werden kann. Es sind daher eher Komplexspezies mit positiver Ladung zu erwarten, die im positiven Mode ESI-massenspektrometrisch detektierbar sein sollten.

Als Lösungsmittel für die Messungen diente ein Methanol/Puffer-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v/v) sowie der reine Puffer. Als Puffer wurde ein Essigsäure/Acetat-Puffer mit pH 4.75 gewählt, um die vollständige Protonierung aller Ammoniumgruppen zu gewährleisten. Die Konzentration des Puffers betrug in beiden Lösungsmittelgemischen 20 mM und war somit 20-mal höher als die des Cyclopeptids. In Abb. 27 ist das Massenspektrum von **2**·3HCl in dem Methanol/Puffer-System im positiven Modus abgebildet. In diesem Spektrum dominieren drei Peaks. Der Peak bei 910.3  $m/z$  konnte dem einfach protonierten Cyclopeptid  $[2+H]^+$  und der bei 932.4  $m/z$  dem Cyclopeptid mit einem Natriumkation  $[2+Na]^+$  zugeordnet werden. Das Signal bei 455.6  $m/z$  entspricht dem zweifach protonierten Cyclopeptid  $[2+2H]^{2+}$ . Das dreifach protonierte Cyclopeptid  $[2+3H]^{3+}$  konnte hingegen nicht beobachtet werden.

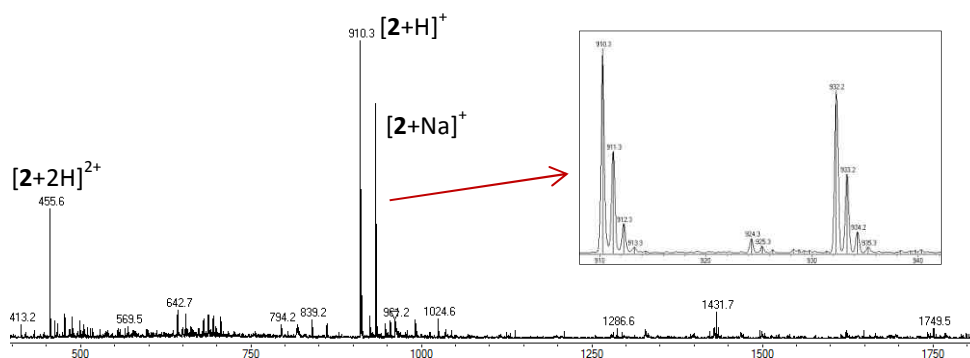
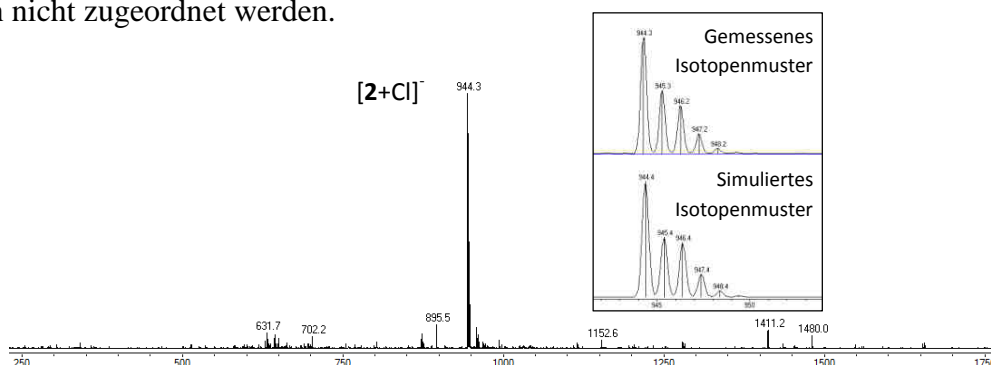


Abb. 27: ESI-MS Spektrum (positiver Modus) von **2**·3HCl (1 mM in Wasser/MeOH 1:1 (v/v) in Anwesenheit von 20 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa).

In dem im negativen Modus aufgenommenen Spektrum findet man im Wesentlichen nur ein Signal, dessen  $m/z$ -Verhältnis dem 1:1 Komplex des ungeladenen Cyclopeptids mit einem Chloridanion  $[2+Cl]^-$  entspricht (Abb. 28). Andere kleinere Peaks in diesem Spektrum konnten nicht zugeordnet werden.





Für die Untersuchung der Anionenaffinität des Cyclopeptids wurden 1 mM Lösungen von **2**·3HCl im jeweiligen Lösungsmittel mit 0.5 equiv des Salzes eines potentiellen anionischen Substrats versetzt und die Massenspektren aufgenommen. Ein weiteres Spektrum wurde nach Zugabe von weiteren 0.5 equiv des Salzes aufgenommen wobei die zweite Salzzugabe üblicherweise keinen großen Einfluss auf das Spektrum hatte. In allen Spektren, die im negativen Modus aufgenommen wurden, war das Signal des 1:1-Addukts des unprotonierten Cyclopeptids mit einem Chloridanion sichtbar. Bei Zusatz von Natriumsulfat wurden die in Abb. 29 und Abb. 30 gezeigten Spektren erhalten. Im positiven Modus treten zusätzlich zu den Signalen bei 910.3  $m/z$  und 932.4  $m/z$ , die bereits im Massenspektrum von **2**·3HCl zu sehen waren, eine Vielzahl weiterer Peaks auf. Diese können einfach positiv geladenen Komplexen zugeordnet werden, die jeweils ein Sulfatanion enthalten. Die Komplexe unterschieden sich lediglich in der Zusammensetzung der drei Gegenionen. Die Peaks konnten dabei wie folgt zugeordnet werden:  $[2+3H+SO_4]^+$  (1008.4  $m/z$ ),  $[2+2H+Na+SO_4]^+$  (1030.4  $m/z$ ),  $[2+H+2Na+SO_4]^+$  (1052.4  $m/z$ ),  $[2+3Na+SO_4]^+$  (1074.4  $m/z$ ).

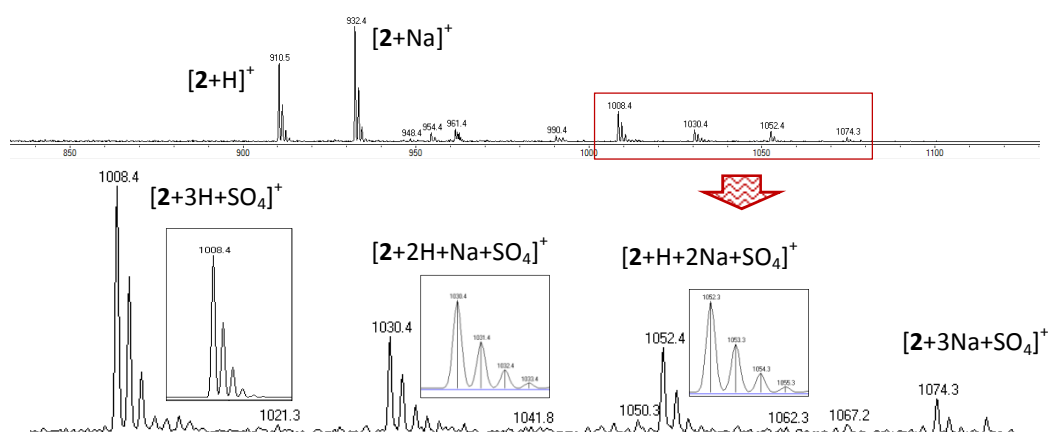


Abb. 29: ESI-MS Spektrum (positiver Modus) von **2** nach Zugabe von 1 equiv  $Na_2SO_4$  (1 mM in Wasser/MeOH 1:1 (v/v) in Anwesenheit von 20 mM  $CH_3COOH/CH_3COONa$ ). In den Kästchen sind jeweils die entsprechenden simulierten Isotopenmuster abgebildet.

In dem im negativen Modus aufgenommenen Spektrum war demgegenüber kein Signal für den Sulfatkomplex sichtbar. Stattdessen konnte nur der einfach geladene Chlorid-Komplex  $[2+Cl]^-$  bei 944.4  $m/z$  beobachtet werden. Auch nach Zugabe eines großen Überschusses an Natriumsulfat änderte sich das Massenspektrum nicht (Abb. 30).

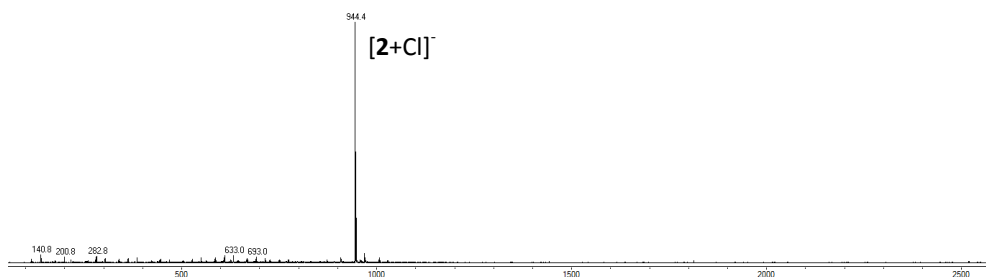


Abb. 30: ESI-MS Spektrum (negativer Modus) von **2** nach Zugabe eines Überschusses  $Na_2SO_4$  (1 mM in Wasser/MeOH 1:1 (v/v) in Anwesenheit von 20 mM  $CH_3COOH/CH_3COONa$ ).

Anders verhält sich **2** nach Zugabe von Natriumiodid. In dem im positiven Modus aufgenommenen Massenspektrum findet man ausschließlich die Peaks, die bereits im Spektrum des reinen Cyclopeptids **2** auftraten (Abb. 31). Erst bei Vergrößerung des Spektrums kann man Signale mit geringer Intensität für den 1:1-Komplex mit Iodid erkennen. Es sind ein einfach geladener Iodidkomplex  $[2+2H+I]^+$  bei 1038.3  $m/z$  als auch ein doppelt positiv geladener Iodidkomplex  $[2+3H+I]^{2+}$  bei 519.7  $m/z$  sichtbar.

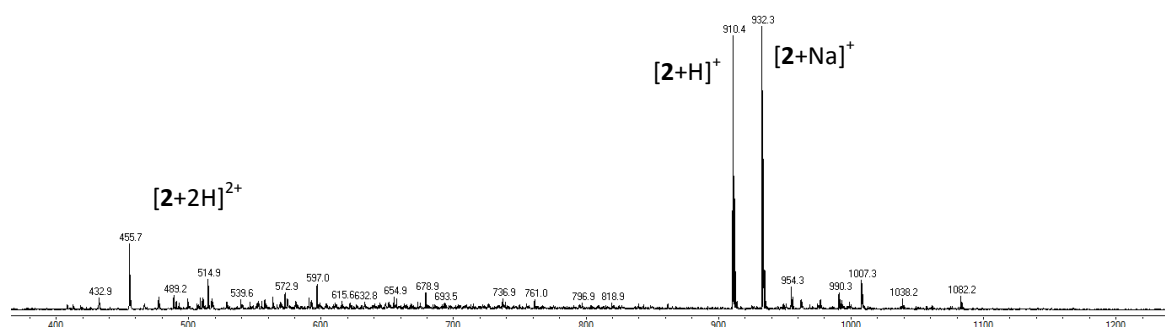


Abb. 31: ESI-MS Spektrum (positiver Modus) von **2** nach Zugabe 1 equiv NaI (1 mM in Wasser/MeOH 1:1 (v/v) in Anwesenheit von 20 mM  $CH_3COOH/CH_3COONa$ ).

Im Gegensatz zur Messung mit Natriumsulfat findet man für Natriumiodid jedoch im negativen Modus aufgenommenen Spektrum ein Signal für den erwarteten 1:1 Komplex mit Iodid  $[2+I]^-$ . Im Vergleich zu dem Peak für den Chlorid-Komplex besitzt dieser jedoch selbst nach Zugabe eines großen Überschusses von Natriumiodid nur eine geringe Intensität (Abb. 32).

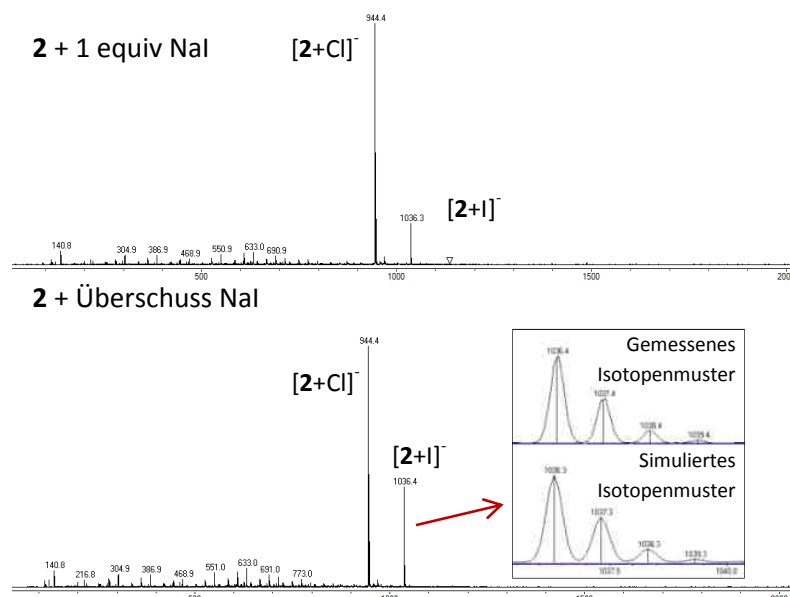


Abb. 32: ESI-MS Spektren (positiver Modus) von **2** nach Zugabe von 1 equiv sowie eines Überschusses an NaI (1 mM in Wasser/MeOH 1:1 (v/v) in Anwesenheit von 20 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa).

Bei Zugabe von jeweils 0.33 equiv NaCl, NaBr sowie NaI zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier erkennt man fast ausschließlich den Chlorid-Komplex  $[2+\text{Cl}]^-$  bei 944.4  $m/z$  im negativen Modus aufgenommenen Massenspektrum (Abb. 33). Als weitere Signale treten hier das einfach deprotonierte Cyclopeptid  $[2-\text{H}]^-$  bei 908.4  $m/z$  sowie der Bromid-Komplex  $[2+\text{Br}]^-$  bei 990.3  $m/z$  und den Iodid-Komplex  $[2+\text{I}]^-$  bei 1036.3  $m/z$  auf.

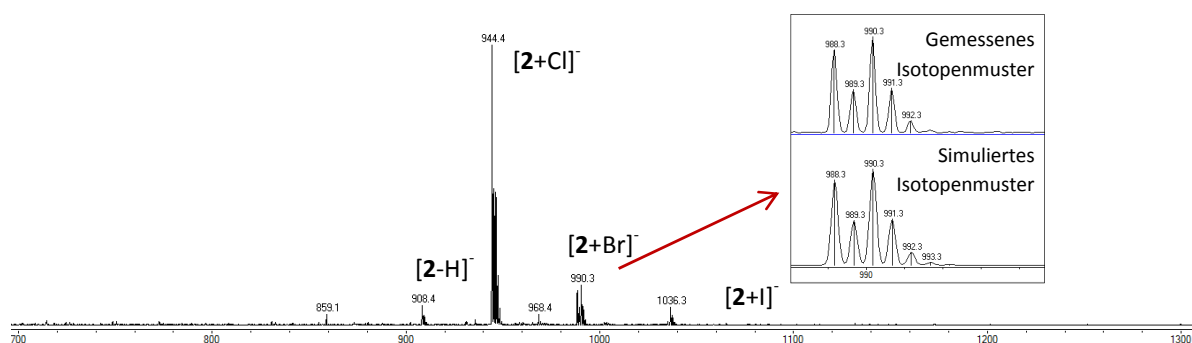


Abb. 33: ESI-MS Spektrum von **2** nach Zugabe einer Mischung aus NaCl, NaBr sowie NaI (1:1:1) (1 mM in Wasser/MeOH 1:1 (v/v) in Anwesenheit von 20 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa), Cap-Exit Wert -120 V.

Zusammenfassend geben die Massenspektren Hinweise auf die Bildung von 1:1 Komplexen mit Anionen. Komplexe mit den Halogeniden lassen sich im negativen Modus detektieren, wobei hierin aber **2** in der vollständig deprotonierten Form vorliegt. Ein 1:1 Komplex aus

einem protonierten Cyclopeptid und einem Sulfatanion mit der Zusammensetzung  $[2+3H+SO_4]^+$  war lediglich im positiven Modus erkennbar.

Weiterhin lässt sich feststellen, dass massenspektrometrisch keine Komplexe oder Assoziate mit Acetatanionen aus dem Puffer detektiert werden konnten.

### *NMR Spektroskopie*

Die Bindung der Anionen in den Cyclopeptiden erfolgt typischerweise über Wasserstoffbrücken zu den Amidgruppen des Peptidgrundgerüsts. Aufgrund des H/D-Austausches in deuterierten protischen Lösungsmitteln treten keine NH Signale im  $^1H$ -NMR Spektrum auf und somit sind NMR spektroskopische Bindungsstudien in wässrigen Lösungsmitteln durch Betrachtung dieser Signale nicht möglich. Wie in vergangenen Bindungsstudien gezeigt werden konnte, kann zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung der Anionenbindung ebenso gut der charakteristische Tieffeldshift der Signale der Prolin H( $\alpha$ )-Protonen herangezogen werden. Diese Protonen befinden sich im Komplex in räumlicher Nähe der NH-Gruppen und ihre Elektronendichte wird daher ebenfalls von der Anwesenheit eines Anions beeinflusst.

Erste Untersuchungen bezüglich der Anionenaffinität von **2** wurden in  $D_2O/CD_3OD$  1:1 (v/v) in An- und Abwesenheit von Puffersalzen durchgeführt und es wurde der Einfluss des Zusatzes von Natriumsulfat auf die Lage der einzelnen Signale in den Spektren untersucht.

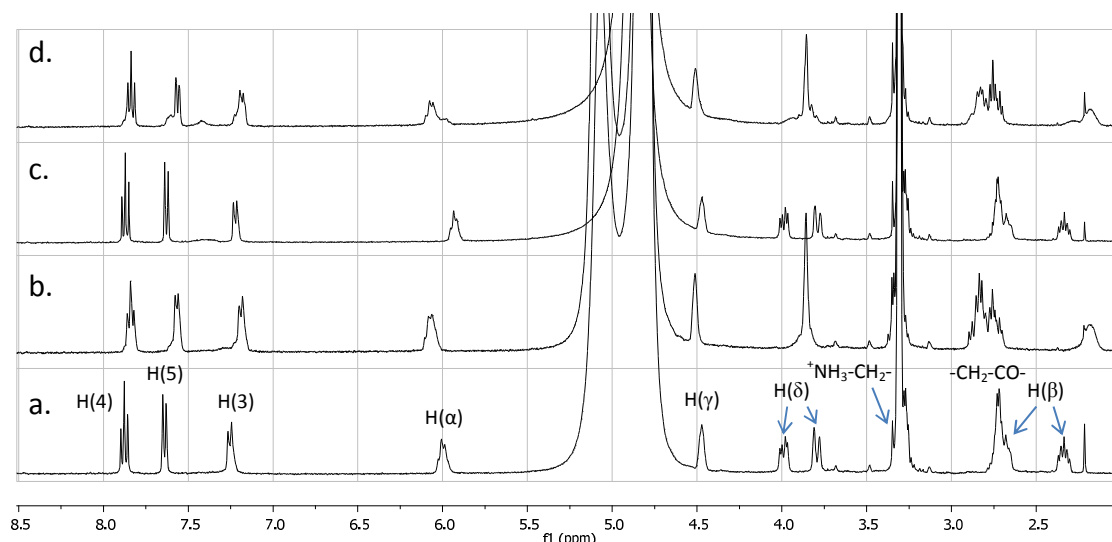


Abb. 34:  $^1\text{H}$ -NMR Spektren des Cyclopeptids **2**·3HCl (1 mM) in  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1 (v/v); a. ohne Gast; b. mit 2 equiv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ; c. ohne Gast in Anwesenheit von 20 mM  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{CD}_3\text{COONa}$ ; d. mit 2 equiv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sowie 20 mM  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{CD}_3\text{COONa}$ .

Der Vergleich der einzelnen Spektren in Abb. 34 zeigt, dass die Anwesenheit des Puffersalzes zu einer etwas kleineren Resonanz des  $\text{H}(\alpha)$ -Signals führt im Vergleich zu dem Spektrum, das in dem ungepufferten Lösungsmittelgemisch aufgenommen wurde. Durch den Natriumsulfatzusatz kommt es dann zu der erwarteten Tieffeldverschiebung des Signals, wobei die chemische Verschiebung davon unabhängig ist, ob die Lösung Puffersalze enthält oder nicht. Darüber hinaus beobachtet man noch weitere charakteristische Unterschiede in den Spektren. So findet man für die beiden  $\text{H}(\delta)$ -Protonen im Spektrum von **2** zwei separate Signale, die bei Komplexbildung zusammen fallen (Zuordnung siehe Abb. 35). Auch die Methylengruppen in der Seitenkette werden durch die Anionenbindung beeinflusst. Der freie Rezeptor zeigt lediglich ein Signal für die H-Atome der Methylengruppe, an die die Amidgruppe gebunden ist (siehe roter Pfeil in Abb. 35). Bei Bindung eines Sulfatanions spaltet dieses Signal auf und es kommt zu einer Überlappung mit dem Peak des benachbarten  $\text{H}(\beta)$ -Protons.

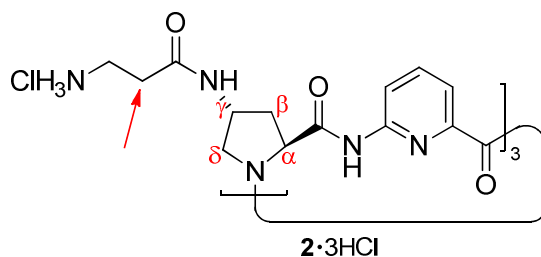


Abb. 35: Zuordnung der Protonen von **2**.

In wässrigen Lösungsmitteln zeigt sich ein analoges Verhalten. Durch den Zusatz von 2 equiv Natriumsulfat verschiebt sich das Signal der H( $\alpha$ )-Protonen um 0.22 ppm zu tieferem Feld (Abb. 36), was ein etwas stärkerer Effekt ist als in den Spektren mit dem organischen Lösungsmittelgemisch. Außerdem fallen auch unter diesen Bedingungen im Spektrum des Komplexes die Signale für die beiden H( $\delta$ )-Atome zusammen und man findet eine veränderte Aufspaltung der Signale zwischen 2.5 und 2.7 ppm.

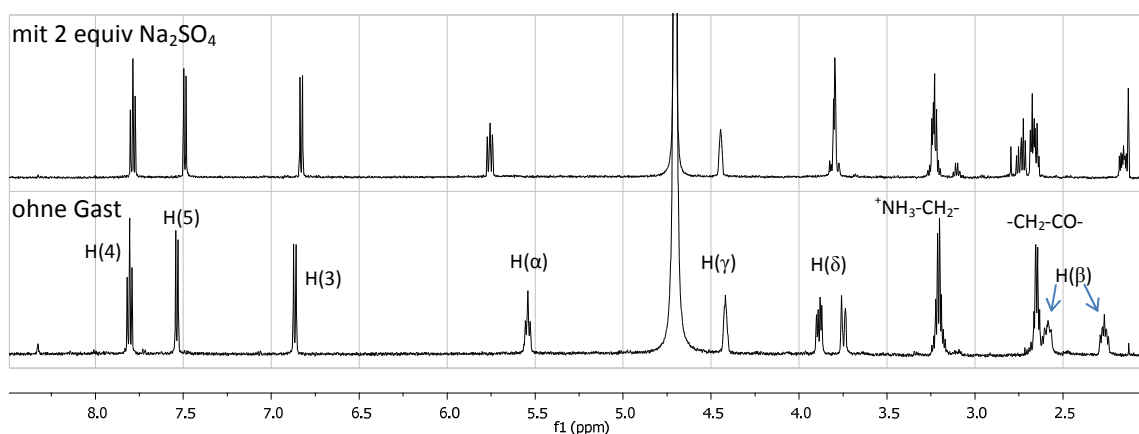


Abb. 36:  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von **2**·3HCl (1 mM) in An- und Abwesenheit von 2 equiv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in gepuffertem  $\text{D}_2\text{O}$  (20 mM  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{CD}_3\text{COONa}$ , pH 4.8).

Damit zeigen sich bei Zusatz von Natriumsulfat zu wässrigen Lösungen von **2** typische Veränderungen in dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum, die andeuten, dass eine Komplexbildung stattfindet und dass die Bindung des Sulfatanions wie bei strukturanalogen Cyclopeptiden an den NH-Gruppen stattfindet. Außerdem legen Veränderungen von Signalen der Protonen in den  $\beta$ -Alaninseitenketten nahe, dass sich diese Reste an der Anionenbindung beteiligen.

Mittels NOESY NMR Spektroskopie wurde versucht, Informationen über die Struktur der gebildeten Komplexe zu erhalten. Leider waren in den erhaltenen Spektren keine

charakteristischen Kreuzsignale zwischen Rezeptorprotonen sichtbar, die Aufschlüsse über die Komplexstruktur gegeben hätten.

### UV-Spektroskopie

Mittels UV-spektroskopischer Untersuchungen sollte ermittelt werden, ab welchem pH-Wert die Pyridinuntereinheiten des Cyclopeptids protoniert werden. Hierfür wurde zunächst das UV-Spektrum einer 0.1 mM Lösung von **2** aufgenommen, deren pH-Wert mit verdünnter Salzsäure auf 1.3 eingestellt wurde. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von verdünnter Natronlauge sukzessive erhöht und nach jeder Zugabe erneut ein UV-Spektrum aufgenommen. Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 28 dargestellt, wobei die Veränderung der Konzentration der Lösung aufgrund des geringen Volumens der Säure- bzw. Basenzugabe vernachlässigt werden konnte.

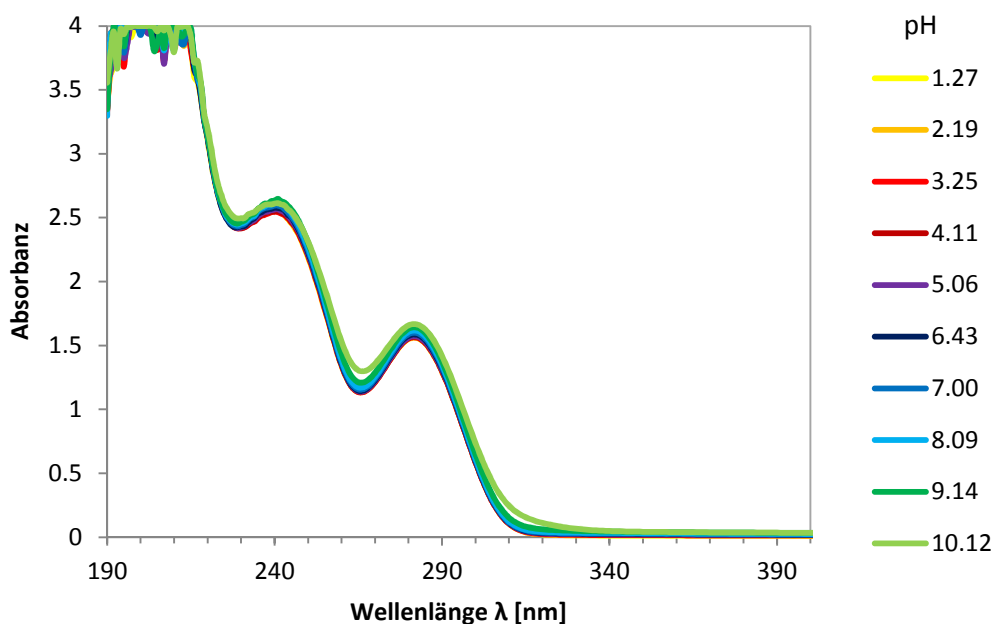


Abb. 37: pH-Wert Abhängigkeit des UV-Spektrums von **2** in Wasser.

Im UV-Spektrum von Pyridin in Hexan treten insgesamt drei Absorptionsbanden auf. Diese korrespondieren mit zwei  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen bei 195 nm sowie 251 nm und einem  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 270 nm, welcher vom freien Elektronenpaar des Ringstickstoffatoms stammt und sich bei Protonierung verändern sollte.<sup>[46]</sup> In den Spektren in Abb. 37 sind ebenfalls drei Banden erkennbar, die analogen Übergängen der 6-Aminopicolinsäure zugeordnet wurden.

Man erkennt keinen Einfluss des pH-Werts auf die Lage oder Intensität dieser Banden, was dafür spricht, dass in dem untersuchten pH-Bereich die heterocyclischen Untereinheiten von **2** nicht in nennenswertem Umfang protoniert werden. Wichtig ist diese Tatsache insbesondere für die im Folgenden beschriebenen potentiometrischen Untersuchungen, da bei der Auswertung der dabei resultierenden Titrationskurven die Anzahl der Protonierungsstufen und somit die Anzahl der Variablen bekannt sein muss.<sup>[47]</sup>

Es wurden ergänzend zwei weitere Titrationen durchgeführt. Zunächst wurde eine analoge Untersuchung in Gegenwart von 1.5 equiv Natriumsulfat durchgeführt. Auch hier war kein Einfluss des pH-Werts auf das UV-Spektrum von **2** erkennbar. In der letzten Messung wurde eine 0.1 mM Lösung von **2** in reinem Wasser, die durch Zugabe von verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 4.8 eingestellt wurde, mit steigenden Mengen Natriumsulfat versetzt. Die UV-Spektren sind in Abb. 38 dargestellt. Die Konzentrationsänderung konnte aufgrund der geringen Volumenänderung während der Titration vernachlässigt werden. Bei der Natriumsulfatzugabe sind zwar kleinere Veränderungen in den UV-Spektren erkennbar, die jedoch nicht die Bestimmung einer Bindungskonstante für den Sulfatkomplex von **2** erlaubten.

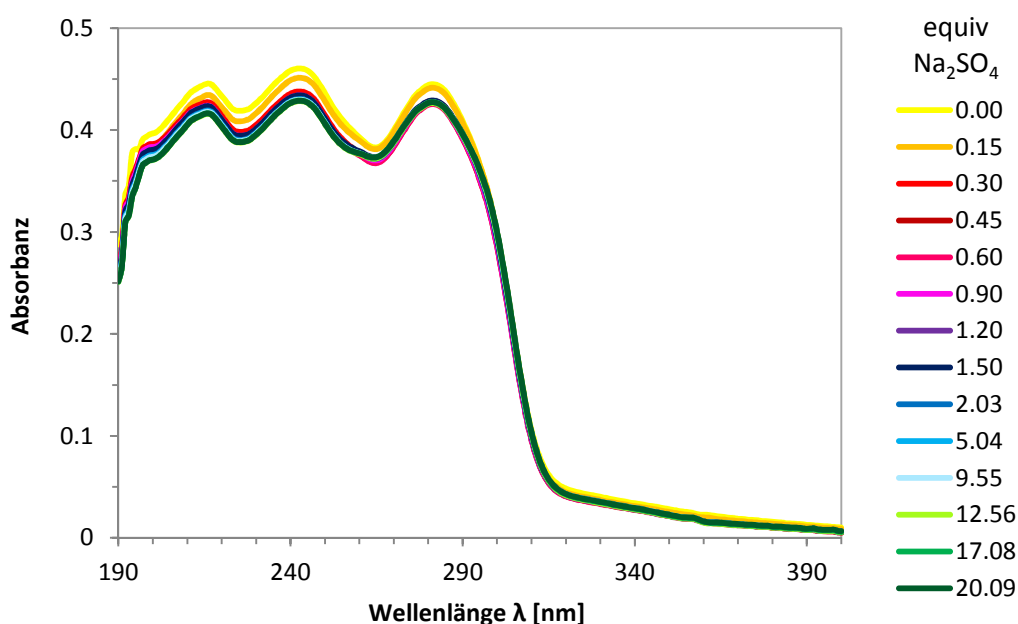


Abb. 38: Einfluss der Natriumsulfatkonzentration auf das UV-Spektrum von **2** in Wasser bei pH 4.8.



**Potentiometrie**

Nachdem mit Hilfe der UV-spektroskopischen Messungen ermittelt werden konnte, wie viele Protonierungskonstanten bei Titration von **2** zu erwarten sind, wurden für die primären Aminogruppen von **2** mittels potentiometrischer Titrations drei Protonierungskonstanten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Man erkennt, dass die einzelnen Protonierungskonstanten mit steigendem Protonierungsgrad des Rezeptors abnehmen, bedingt durch die zunehmenden abstoßenden Coulomb-Wechselwirkungen der Ammoniumgruppen untereinander.

Tabelle 3 Potentiometrisch ermittelte Protonierungskonstanten von **2** bei 298.1 K in 0.15 M wässriger NaCl-Lösung.

global		stufenweise	
Reaktion <sup>a</sup>	log $\beta$	Reaktion <sup>a</sup>	log $K_{\text{CPHn}}$
<b>2</b> + H $\rightleftharpoons$ <b>2H</b>	9.62(2) <sup>b</sup>	<b>2</b> + H $\rightleftharpoons$ <b>2H</b>	9.62(2) <sup>b</sup>
<b>2</b> + 2 H $\rightleftharpoons$ <b>2H<sub>2</sub></b>	18.96(2) <sup>b</sup>	<b>2H</b> + H $\rightleftharpoons$ <b>2H<sub>2</sub></b>	9.35(2) <sup>b</sup>
<b>2</b> + 3 H $\rightleftharpoons$ <b>2H<sub>3</sub></b>	27.45(2) <sup>b</sup>	<b>2H<sub>2</sub></b> + H $\rightleftharpoons$ <b>2H<sub>3</sub></b>	8.48(2) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ladungen einfachheitshalber weggelassen <sup>b</sup> Die Werte in Klammern sind Standardabweichungen in der letzten signifikanten Stelle

Auf Basis dieser Protonierungskonstanten wurde das in Abb. 39 dargestellte Verteilungsdiagramm berechnet.

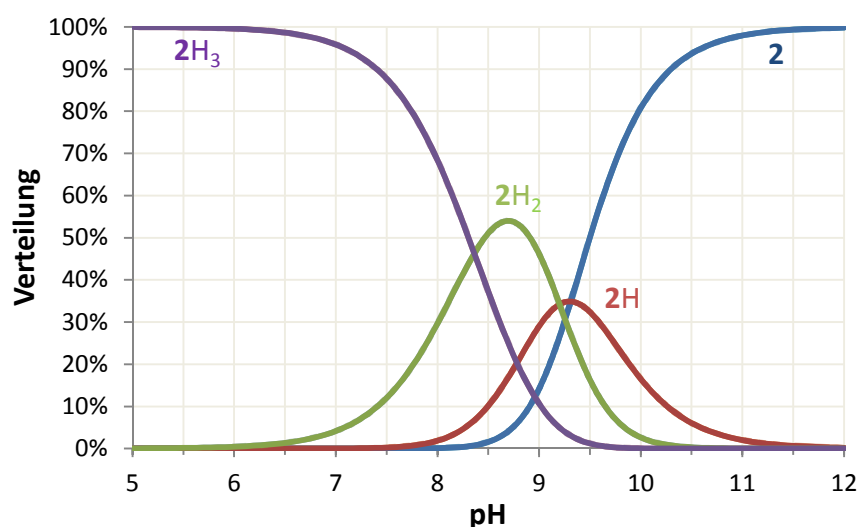


Abb. 39: Verteilungsdiagramm der Protonierungsstufen von **2** in Abhängigkeit des pH-Wertes bei 298.1 K in 0.15 M wässriger NaCl-Lösung.

Aus Abb. 39 geht hervor, dass das vollständig protonierte Cyclopeptid bis pH 8 in der Lösung dominiert. Die Konzentration nimmt mit steigendem pH kontinuierlich ab, bis bei pH 8.8 das zweifach protonierte Cyclopeptid als Hauptform auftritt. Bei ungefähr pH 9.5 erreicht die Konzentration des einfach protonierten Cyclopeptids die maximale Konzentration bis ab pH 12 ausschließlich das Cyclopeptid mit drei nicht protonierten Aminogruppen zu finden ist.

Im nächsten Schritt wurde die Stabilitätskonstante des Sulfatkomplexes von **2** bestimmt. Hierfür wurde die potentiometrische Titration in Gegenwart von 2 equiv Natriumsulfat durchgeführt. Neben einer Titration in 0.15 M wässriger NaCl-Lösung wurde auch eine Titration in Wasser ohne Elektrolytzugabe versucht. Die bei den beiden Messungen resultierenden Bindungskonstanten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Bindungskonstanten für **2** mit 2 equiv Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A) bei 298.1 K.

0.15 M NaCl		pures Wasser	
Reaktion <sup>a</sup>	log $K_{\text{CPAHn}}$	Reaktion <sup>a</sup>	log $K_{\text{CPAHn}}$
$2\text{H}_2 + \text{A} \rightleftharpoons 2\text{AH}_2$	2.48	$2\text{H}_2 + \text{A} \rightleftharpoons 2\text{AH}_2$	2.75 <sup>b</sup>
$2\text{H}_3 + \text{A} \rightleftharpoons 2\text{AH}_3$	2.77	$2\text{H}_3 + \text{A} \rightleftharpoons 2\text{AH}_3$	3.49 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ladungen einfachheitshalber weggelassen, <sup>b</sup> Für die Berechnung dieser Werte wurden die in 0.15 M wässriger NaCl-Lösung ermittelten globalen Protonierungskonstanten verwendet.

Tabelle 4 zeigt, dass mit Bindungskonstanten log  $K_a$  von ca. 2.5 für den zweifach protonierten Rezeptor und von ungefähr 2.8 für den dreifach protonierten Rezeptor Cyclopeptid **2** sogar in Gegenwart eines großen Überschusses an Chloridionen eine beachtliche Sulfataffinität besitzt. In reinem Wasser ist die Sulfataffinität erwartungsgemäß noch höher, wobei die entsprechenden Werte in Tabelle 4 jedoch mit einem größeren Fehler behaftet sind, da für deren Berechnung die in 0.15 M wässriger NaCl-Lösung bestimmten globalen Protonierungskonstanten verwendet wurden.

Diese quantitativen Daten zur Sulfataffinität von **2** sollten nun durch eine unabhängige Methode, nämlich die isotherme Titrationskalorimetrie, verifiziert werden.

***Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)***

Bei der isothermen Titrationskalorimetrie wird direkt die Wärme gemessen, die bei einer Komplexbildung freigesetzt oder für die Komplexbildung benötigt wird. Der schematische Aufbau eines Mikrokalorimeters ist in Abb. 31 dargestellt.

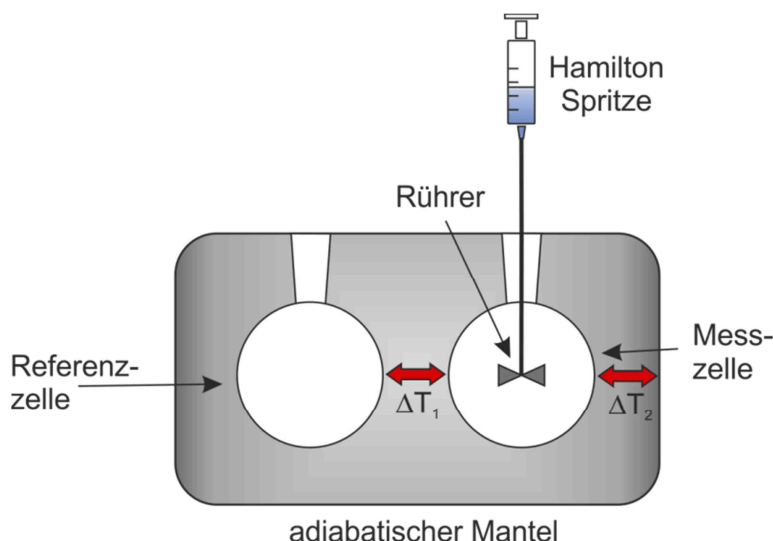


Abb. 40: Aufbau eines Titrationskalorimeters.

Sowohl die Mess- als auch die Referenzzelle sind in einem adiabatischen Block eingelassen, um einen Austausch von Wärme mit der Umgebung zu vermeiden. Bei einem ITC-Experiment wird üblicherweise der Rezeptor, in diesem Fall also **2**, in der Messzelle vorgelegt und anschließend das Gastmolekül über eine automatische Injektionsspritze in vorher festgelegten Intervallen zugegeben. Anschließend wird nach jeder Injektion der Strom gemessen, der benötigt wird, um die Mess- und die Referenzzelle, die üblicherweise mit dem reinen Lösungsmittel gefüllt wird, wieder auf die gleiche Temperatur zu bringen. Dieser Betrag korreliert mit der während der Reaktion abgegebenen bzw. aufgenommenen Wärmemenge  $\Delta Q$  und damit mit der Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ . In Abb. 41 sind in grau die Wärmepulse einer Titration gegen den Molenbruch aufgetragen, aus denen durch Integration eine Bindungsisotherme, dargestellt durch die schwarzen Punkte, resultiert. Diese sollten im Idealfall einen sigmoidalen Verlauf besitzen. Der Wendepunkt der Kurve enthält Informationen zur Komplexstöchiometrie, die Stufenhöhe beschreibt die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  und aus der Kurvenform kann durch nicht-lineare Regression die Stabilitätskonstante  $K_a$  berechnet werden.

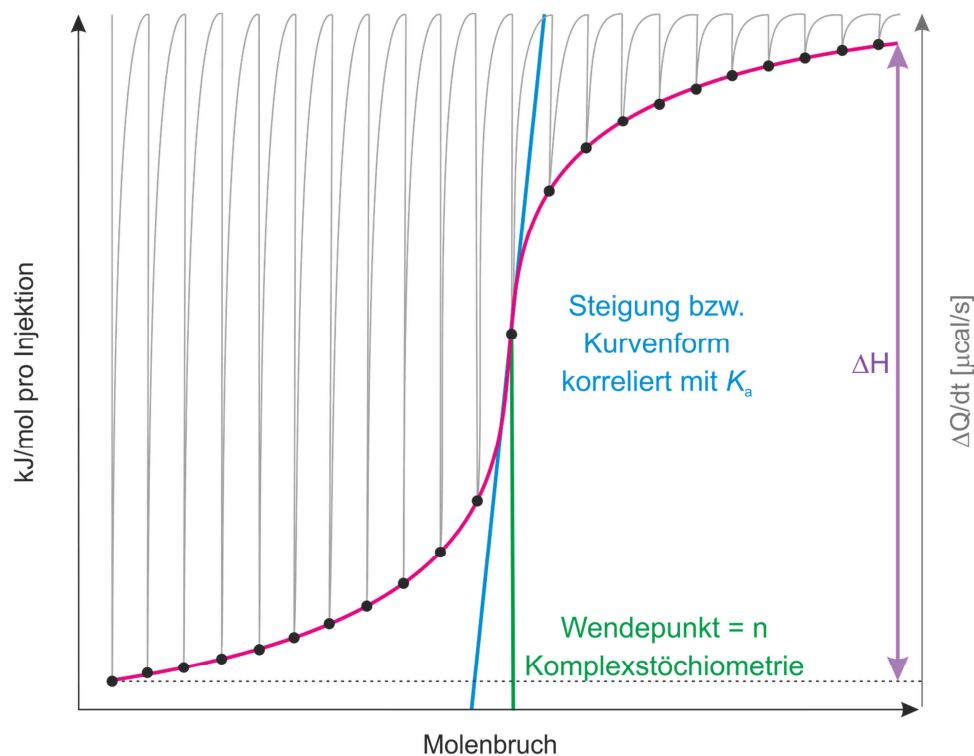


Abb. 41: Beispiel für eine ITC-Messung: Die grauen Ausschläge zeigen die Wärmepulse der einzelnen Injektionen während die schwarzen Punkte die Integrale der einzelnen Peaks darstellen. Die magenta-farbene Kurve veranschaulicht den Fit der Messdaten.

Mit Hilfe der van't Hoff-Gleichung  $\Delta G = -RT \ln K_a$  lässt sich aus der Bindungskonstanten  $K_a$  die Freie Enthalpie  $\Delta G$  bestimmen und anschließend erhält man über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  aus  $\Delta G$  und  $\Delta H$  somit auch die Entropie  $\Delta S$ .

Ein deutlich sigmoidaler Kurvenverlauf der Bindungsisothermen, der eine verlässliche Bestimmung der Komplexstöchiometrie ( $n$ ) durch Kurvenanpassung erlaubt wird allerdings in der Regel nur bei stabilen Komplexen beobachtet. Bei instabilen flacht die Kurve ab und die Bestimmung von  $n$  bzw.  $K$  wird ungenau. Aus diesem Grund wurde der Stöchiometriefaktor  $n$  bei den hier durchgeführten Messungen nur durch nicht-lineare Regression ermittelt wenn die Komplexstabilität  $\log K_a > 4$  betrug. Bei weniger stabilen Komplexen wurde  $n = 1$  gesetzt und die Bindungsisotherme entsprechend auf Basis des mathematischen Modells für 1:1 Komplexe gefittet. Dieses Bindungsmodell wurde bei allen hier durchgeführten Titrationsen verwendet.

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Anionenaffinität von **2**·3HCl und die der Z-geschützten Vorstufe **20** ermittelt. Zunächst wurden die Untersuchungen mit **20** durchgeführt. Als Anionen wurden Sulfat, Tosylat, Bromid und Iodid, jeweils in Form ihrer Natriumsalze verwendet. Die Titrationsen wurden in Wasser/Methanol 1:1 (v/v) durchgeführt. Die thermodynamischen Parameter der Komplexbildungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Tabelle 5 Thermodynamische Daten der Komplexbildung von **20** mit Sulfat, Tosylat, Iodid und Bromid sowie **37** mit Sulfat und Tosylat in Wasser/Methanol 1:1 (v/v) bei 298.1 K.

	<b>20</b>				<b>37</b>	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOTs	NaI	NaBr	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>a</sup>	NaOTs <sup>a</sup>
log K <sub>a</sub>	3.77 ± 0.05	3.43 ± 0.02	2.88 ± 0.02	2.34 ± 0.02	3.77	3.16
ΔG <sup>0</sup> / kJ·mol <sup>-1</sup>	-21.51 ± 0.29	-19.56 ± 0.09	-15.85 ± 0.14	-13.34 ± 1.85	-21.51	-18.03
ΔH <sup>0</sup> / kJ·mol <sup>-1</sup>	-13.93 ± 1.33	-18.39 ± 0.89	-12.90 ± 1.16	-9.69 ± 1.26	-12.58	-10.27
TΔS <sup>0</sup> / kJ·mol <sup>-1</sup>	7.57 ± 1.44	1.17 ± 0.98	2.95 ± 1.30	4.95 ± 1.44	8.94	7.76

c(CP) = 1 mM, c(Gast) = 20 mM, n-Wert auf 1 festgesetzt, <sup>a</sup> nur eine Messung durchgeführt, unveröffentlichte Ergebnisse

Man erkennt, dass alle Komplexe eine Stabilität in ähnlicher Größenordnung besitzen. Dabei ist der Sulfatkomplex am stabilsten was v.a. auf die doppelte Ladung des Sulfatanions zurückzuführen ist. Die Komplexstabilität nimmt dann in der Reihenfolge SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > OTs<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> ab. Das stärker koordinierende Sulfatanion wird also stärker gebunden als die Halogenide. Die Stabilität der Komplexe mit dem eigentlich schwächer koordinierenden Iodidanion ist höher als die des Bromidkomplexes, da das größere Iodidanion aus geometrischen Gründen besser an die NH-Gruppen des Rezeptors binden kann. Eine analoge Reihenfolge der Komplexstabilitäten zeigt auch die Mehrzahl der bisher in der Gruppe synthetisierten anionenbindenden Cyclopeptide.<sup>[48]</sup> Bei allen Anionen ist die Komplexbindung exotherm.

Zum Vergleich enthält die Tabelle Ergebnisse zur Sulfat- sowie Tosylataffinität eines von S. Stüwe beschriebenen Cyclopeptids **37** mit Z-geschützten α-Alaninseitenketten, welche unter analogen Bedingungen ermittelt wurden. Die Struktur von **37** ist in Abb. 33 dargestellt. Die Tosylataffinität dieser Verbindung liegt in der gleichen Größenordnung wie die von **20**. Die einzelnen thermodynamischen Parameter unterscheiden sich aber signifikant.

Bei **20** ist die Komplexbildung weniger enthalpiegetrieben, dafür ist die Komplexbildungsentropie ebenfalls günstig. Die Struktur und Flexibilität der Seitenketten in diesen Cyclopeptiden haben also einen entscheidenden Einfluss auf die thermodynamischen Parameter der Komplexbildung, wobei die genauen Ursachen für die Einflüsse jedoch auf Basis dieser Einzelmessungen nicht genau angegeben werden können.

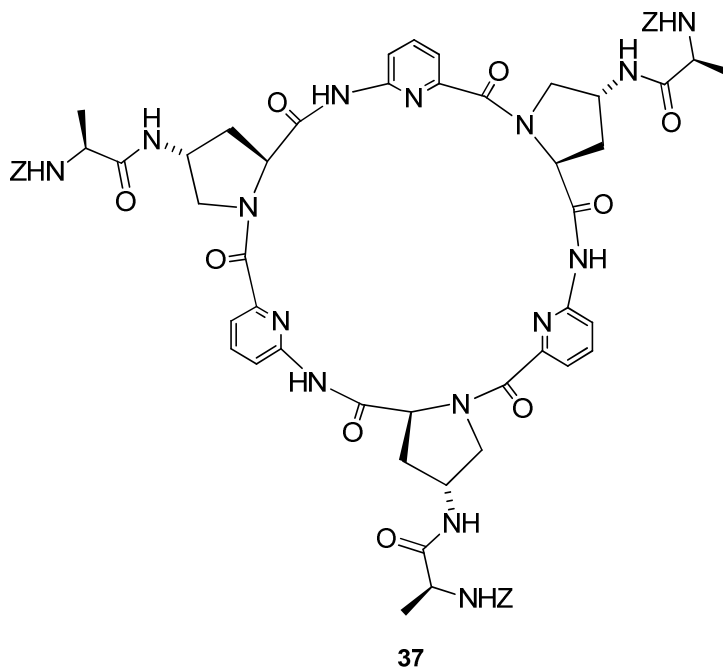


Abb. 42: Struktur des Cyclopeptids **37** mit  $\alpha$ -Alaninseitenketten.

Im Anschluss wurde die Anionenaffinität von **2**·3HCl mittels ITC charakterisiert. Dabei wurde ein analoges Lösungsmittelsystem verwendet (Wasser/Methanol 1:1 (v/v) mit 20 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa) wie bei den massenspektrometrischen Untersuchungen. Durch den Acetatpuffer (pH 4.8) wurde gewährleistet, dass alle drei Ammoniumgruppen von **2** protoniert sind.

In Abb. 43 ist eine typische Bindungsisotherme für eine Messung unter den oben angegebenen Bedingungen abgebildet. Der Wendepunkt der Kurve liegt ungefähr bei 1, was die Bildung eines 1:1-Komplexes belegt.

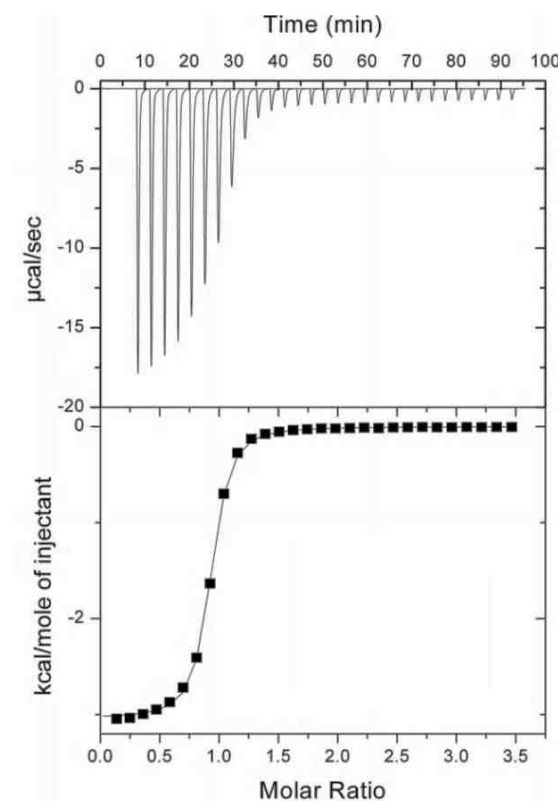


Abb. 43: Messkurve sowie Bindungsisotherme der ITC-Titration von **2** mit Natriumsulfat in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) mit 20 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ .

Unter analogen Bedingungen wurde eine Titration mit dem Hydroxyprolin-haltigen Cyclopeptid **38** durchgeführt, das ebenfalls wasserlöslich ist und 1:1 Komplexe mit Anionen bildet. Es trägt jedoch keine Seitenketten, die sich an der Anionenbindung beteiligen können.

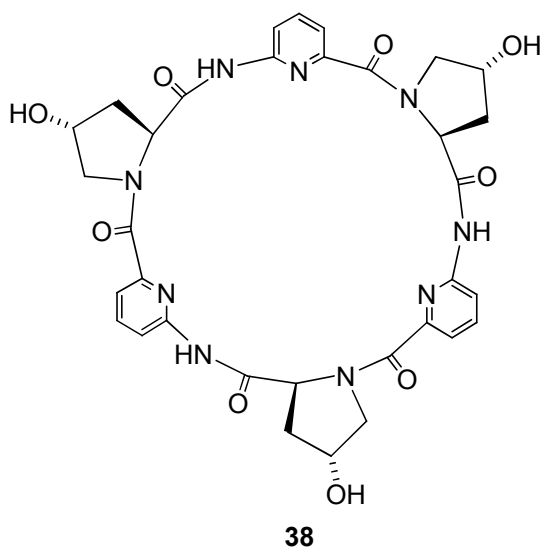


Abb. 44: Referenzcyclopeptid **38** bestehend aus 6-Aminopicolinsäure- und 4*R*-Hydroxyprolineinheiten.

Mit Hilfe dieser Titrationsen sollte ebenfalls der Einfluss der Seitenkette auf die Sulfataffinität der Cyclopeptide untersucht werden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Stabilitätskonstanten  $K_a$ , Freie Enthalpie  $\Delta G$ , Enthalpie  $\Delta H$  und Entropie  $T\Delta S$  der Komplexe von **2** mit Sulfat und Tosylat sowie von **38** mit Sulfat in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) in Anwesenheit von 20 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  bei 298.1 K und einem pH von 4.8.

	<b>2</b> ·3HCl		<b>38</b>
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{NaOTs}^a$	$\text{Na}_2\text{SO}_4^a$
n	$0.85 \pm 0.03$	1	1
$\log K_a$	$5.10 \pm 0.04$	$2.80 \pm 0.07$	$2.36 \pm 0.01$
$\Delta G^0 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$-29.13 \pm 0.24$	$-15.99 \pm 0.39$	$-13.45 \pm 0.05$
$\Delta H^0 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$-13.09 \pm 0.42$	$-13.75 \pm 0.57$	$-10.56 \pm 0.29$
$T\Delta S^0 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$16.05 \pm 0.60$	$2.24 \pm 0.93$	$2.88 \pm 0.25$

c(CP) = 1 mM, c(Gast) = 20 mM, c(Puffer) = 20 mM, <sup>a</sup> n-Wert auf 1 festgesetzt

Vergleicht man die erhaltenen Daten der Messungen miteinander, so sticht v.a. die Messung von **2** mit Sulfat heraus. Die Bindungskonstante ist in diesem Fall fast doppelt so groß wie die, die mit Natriumtosylat erhalten wurde. Die Stabilität dieses Komplexes liegt ungefähr in derselben Größenordnung wie die von **38** mit Sulfat. Bei Betrachtung der einzelnen thermodynamischen Parameter liegen die Werte für die Bindungsenthalpie etwa im gleichen Rahmen, die Bindungsentropien unterscheiden sich jedoch signifikant. So ist die Entropie bei Bildung des Sulfatkomplexes mehr als 7-mal so groß wie die des Tosylatkomplexes, während die Enthalpien etwa gleich groß sind. Die stärkere Bindung ist auf den höheren Entropieanteil zurückzuführen.

Analoge Messungen wurden ebenfalls mit den Halogeniden durchgeführt, allerdings konnten die erhaltenen Kurven nicht auf Basis der Bildung von 1:1-Komplexen ausgewertet werden. Mit Hilfe eines 2:1 Modelles ist eine Auswertung zwar möglich, jedoch konnten über die ESI-Analysen lediglich 1:1-Komplexe nachgewiesen werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das Verhalten des Cyclopeptids in Lösung von dem in der Gasphase abweicht. Weitere Titrationsen mit Nitrat, Perchlorat oder auch Dihydrogenphosphat zeigten, dass diese nicht bzw. nur sehr schwach von **2** gebunden werden.



Im Folgenden wurden Titrations in Wasser in Anwesenheit verschiedener Puffer bzw. Salze durchgeführt, mit denen der pH auf einen bestimmten Wert eingestellt wurde. Durch diese Untersuchungen sollte der Einfluss des pH-Wertes auf die Sulfatbindung von **2** verfolgt werden. Als Puffersysteme wurden auch verschiedene Phosphatsalze eingesetzt, um zu sehen, wie der Einfluss der zu dem Sulfatanion strukturell analogen Phosphatanionen auf die Sulfatbindung ist. Hierbei liegen die Phosphatanionen bei pH 7 wenigstens noch einfach deprotoniert vor. Die Konzentrationen der Puffer- bzw. Salzlösungen wurden so gewählt, dass sie dem 20fachen der Konzentration der Rezeptorlösung und dadurch den Bedingungen der Titration in Acetatpuffer/Methanol 1:1 (v/v) bei pH 4.8 entsprachen. Lediglich bei der Messung, die unter denselben Bedingungen wie die potentiometrische Titration durchgeführt wurde, wurde als Konzentration der NaCl-Lösung 0.15 M gewählt. In Tabelle 7 sind die erhaltenen Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 7      Thermodynamische Parameter der Sulfatbindung von **2**·3HCl in Wasser in Anwesenheit eines Salzes und verschiedenen pH-Werten bei 298.1 K.

LM	Puffer/Salz	pH	log $K_a$	$\Delta H^0$ / kJ·mol <sup>-1</sup>	$T\Delta S^0$ / kJ·mol <sup>-1</sup>	n
MeOH/H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> COONa <sup>a</sup>	4.8	5.10 ± 0.04	-13.09 ± 0.42	16.05 ± 0.60	0.85 ± 0.03
H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> COONa <sup>a</sup>	4.8	4.20 ± 0.01	-13.47 ± 0.10	10.50 ± 0.09	0.88 ± 0.01
H <sub>2</sub> O	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	7.0	2.44 ± 0.01	-3.43 ± 0.07	10.50 ± 0.09	1
H <sub>2</sub> O	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	4.6	3.62 ± 0.15	-5.20 ± 0.20	15.48 ± 1.07	1
H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	2.3	3.88 ± 0.13	-7.33 ± 0.73	14.81 ± 1.38	1
H <sub>2</sub> O	NaCl <sup>c</sup>	3.8	2.87 ± 0.01	-4.27 ± 0.08	12.14 ± 0.09	1

<sup>a</sup> c(CP) = 1 mM, c(Gast) = c(Salz) = 20 mM, <sup>b</sup> c(CP) = 2.5 mM, c(Gast) = c(Salz) = 50 mM, <sup>c</sup> c(CP) = 2.5 mM, c(Gast) = 50 mM, c(Salz) = 0.15 M

In allen durchgeführten Messungen wurde trotz der Gegenwart konkurrierender Anionen eine Sulfatkomplexierung beobachtet. Der Einfluss des höheren Wasseranteils in Anwesenheit des Acetatpuffers führte zu einer Abnahme der Bindungsentropie von 16.05 kJ/mol zu 10.50 kJ/mol. Enthalpisch profitierte die Bindung hingegen von der Änderung: die Enthalpie wurde von -13.47 kJ/mol in Wasser im Vergleich zu -13.09 kJ/mol in dem organischen Lösungsmittelgemisch etwas günstiger. In Gegenwart der Phosphatsalze nimmt die Sulfataffinität mit sinkendem pH zu. Dieser Trend korreliert mit der Enthalpie der Komplexbildung, die mit abnehmendem pH immer günstiger wird. In Bezug auf die Entropie zeigt sich hingegen keine eindeutige Tendenz. In der NaCl-Lösung wurde eine annähernd

gleiche Bindungskonstante gemessen, wie sie schon mit Hilfe der potentiometrischen Messungen ermittelt werden konnte. Alle Untersuchungen haben gemein, dass die Bindung des Sulfatanions sowohl enthalpisch als auch entropisch getrieben ist.

### 2.4 Diskussion

Beim Vergleich der bei den ITC Titrationsen erhaltenen thermodynamischen Daten zeigte sich, dass die beiden ähnlichen Cyclopeptide **20** und **37** für Sulfat in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) die gleiche Bindungskonstanten aufweisen ( $\log K_a = 3.77$ ). Die Bindungsenthalpien und -entropien der jeweiligen Komplexbildungen unterscheiden sich nicht erheblich. Die Differenz beträgt lediglich 1.35 kJ/mol bei der Enthalpie  $\Delta H$  bzw. 1.44 kJ/mol der Entropie  $T\Delta S$ . Anders verhält sich das Ganze im Falle von Tosylat. Hier sind die Affinitäten der beiden Cyclopeptide relativ ähnlich ( $\log K_a(\mathbf{20}) = 3.43$ ,  $\log K_a(\mathbf{37}) = 3.16$ ), die einzelnen Parameter variieren jedoch stark. So ist die Bindung von **20** sehr stark enthalpisch getrieben ( $\Delta H(\mathbf{20}) = -18.4$  kJ/mol,  $\Delta H(\mathbf{37}) = -10.3$  kJ/mol) während sie bei **37** eher von der Entropie profitiert ( $T\Delta S(\mathbf{20}) = 1.17$  kJ/mol,  $T\Delta S(\mathbf{37}) = 7.76$  kJ/mol). Ein Grund hierfür könnte in der Flexibilität der Seitenkette liegen. So ist diese in **20** durch die Ethylengruppe des  $\beta$ -Alanins nicht nur anpassungsfähiger sondern auch länger, so dass es hier gegebenenfalls zur Ausbildung von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Benzylresten der Z-Schutzgruppen und dem Tolyrest des Tosylats kommen kann. Dies fixiert das Wirtmolekül in einer bestimmten Konformation und wirkt sich somit negativ auf die Entropie aus. In **37** hingegen sind die Seitenketten zu starr und durch die Anwesenheit der stereogenen Zentren auch in ihrer Rotation behindert, so dass eine Wechselwirkung zwischen den aromatischen Untereinheiten nicht möglich ist.

Nach Abspaltung der Z-Schutzgruppen von **20** nimmt die Sulfataffinität in Methanol/Acetatpuffer 1:1 (v/v) deutlich auf  $\log K_a = 5.10$  zu. Hierfür können zunächst einmal attraktive Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast verantwortlich gemacht werden. Daneben können die in der berechneten Struktur des Sulfatkomplexes (Abb. 22) von **2** ersichtlichen intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den Ammoniumgruppen und den Carboxygruppen der Seitenketten, die bei dem Z-geschützten Derivat nicht möglich sind, den Komplex zusätzlich stabilisieren. Dieser Umstand sollte sich auf den ersten Blick in einen günstigeren Enthalpiebeitrag der Komplexbildung im Vergleich zu **20** zeigen, jedoch sind die Werte für die beiden Rezeptoren nahezu identisch. Die stärkere Bindung von **2** wird also

ausschließlich durch die Entropie begünstigt. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass die Titration von **20** in Abwesenheit von Puffersalzen und die von **2**·3HCl in Gegenwart von Puffersalzen durchgeführt wurde und die Messbedingungen daher nicht ganz vergleichbar sind. Die vergleichbaren Komplexbildungsenthalpien können also durchaus zufälligerweise ähnlich groß sein. Es muss berücksichtigt werden, dass alle in Lösung vorhandenen Komponenten, bei der Titration von **2** also auch die Puffersalze, alle Beiträge zur Thermodynamik der Komplexbildung liefern. Entscheidend ist also eher die insgesamt hohe Komplexstabilität, die für den Sulfatkomplex von **2** in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) mit 20 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa beobachtet wurde und die eindeutig auf die Gegenwart der protonierten Ammoniumgruppen in den Seitenketten zurückzuführen ist, als die einzelnen thermodynamischen Parameter der Bindung. Im Einklang mit der Annahme, dass sich die Seitenketten von **2** an der Anionenbindung beteiligen, steht das Ergebnis, dass das Cyclopeptid **38** unter denselben Bedingungen einen um fast drei Größenordnungen weniger stabilen Sulfatkomplex bildet.

Bei Verwendung eines rein wässrigen Lösungsmittels nimmt die Sulfataffinität von **2** trotz des kompetitiven Charakters von Wasser nur von  $\log K_a = 5.10$  Methanol/Wasser 1:1 (v/v) mit 20 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa auf  $\log K_a = 4.20$  ab. Durch den höheren Wasseranteil sollten hierbei sowohl der Rezeptor als auch das Sulfat stärker solvatisiert sein und man würde daher in erster Näherung erwarten, dass die Abnahme der Komplexstabilität auf einen ungünstigen Beitrag der Komplexbildungsenthalpie zurückzuführen ist. In der Tat ist aber die Bindungsenthalpie in Wasser sogar günstiger als in dem Lösungsmittelgemisch mit Methanol und die Abnahme der Komplexstabilität beruht allein auf einem ungünstigeren entropischen Term. Dieses Verhalten steht im Einklang mit den Beobachtungen, die mit anderen Cyclopeptiden gemacht wurden. Auch dort führte ein höherer Wasseranteil im Lösungsmittelgemisch zu einer enthalpisch günstigeren Bindung.<sup>[49]</sup> Die Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter von der Zusammensetzung des Lösungsmittels lässt sich über die spezifischen Eigenschaften des Sulfats erklären. Dieses ist wahrscheinlich bevorzugt durch Wassermoleküle solvatisiert. Je weniger Wasser das Lösungsmittelgemisch nun enthält, desto stärker werden die Wassermoleküle an das Sulfatanion koordiniert und desto strukturierter ist das gebildete Aggregat. Bei Komplexbildung des Anions muss nun diese Solvathülle abgestreift werden, was sich einerseits in einem günstigeren Entropiebeitrag durch Freisetzen der Lösungsmittelmoleküle zeigen sollte. Andererseits muss hierfür jedoch auch Energie

aufgewendet werden, welche einen negativen Einfluss auf die Gesamtenthalpie der Komplexbildung besitzt.

Die Messreihe in Gegenwart von Phosphatsalzen bei verschiedenen pH-Werten zeigte, dass die Sulfataffinität von **2** mit sinkendem pH-Wert zunimmt. Ein Trend lässt sich hierbei in dem Enthalpiebeitrag ablesen, der mit abnehmendem pH günstiger wird. Der Entropieterm korreliert dagegen nicht eindeutig mit dem pH-Wert. Da die potentiometrischen Untersuchungen zeigten, dass **2** schon bei pH 7 fast vollständig protoniert vorliegt, ist es unwahrscheinlich, dass für die beobachtete Abhängigkeit verschiedene Protonierungsstufen des Cyclopeptids verantwortlich sind. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Konkurrenz der Bindung von Sulfat- und Phosphatanionen an den Rezeptor eine Ursache für den Trend sind. Nimmt man an, dass die in Lösung vorhandenen Hydrogenphosphatanionen aufgrund der drei Wasserstoffbrückenakzeptoren in diesem Anion stärker an **2** binden als Dihydrogenphosphatanionen, welche nur zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren besitzen, so ist es plausibel, dass die Sulfatbindung von **2** in stärker sauren Lösungen, in denen Dihydrogenphosphatanionen überwiegen, stärker ist.

Der Vergleich der Bindungskonstanten, die mit Hilfe der Potentiometrie und der ITC erhalten wurden, zeigt, dass die Werte beider Methoden vergleichbar sind. Damit liefern diese beiden Messungen wertvolle Hinweise auf die Verlässlichkeit der Ergebnisse. In 0.15 M Natriumchloridlösung liefert v.a. die Entropie eine wichtige Triebkraft für die Komplexbildung. Da die massenspektrometrischen Messungen gezeigt haben, dass auch Chloridionen an **2** binden, kann man aus dem Ergebnis zudem erkennen, dass **2** wahrscheinlich aufgrund seiner strukturellen Komplementarität zu Sulfat eine hohe Bindungsselektivität für dieses Anion besitzt.

## 2.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Teilprojektes meiner Dissertation konnte Cyclopeptid **2** mit drei  $\beta$ -Alaninseitenketten erstmals synthetisiert werden. Aufgrund der drei Ammoniumgruppen ist dieses Peptid in reinem Wasser löslich. Damit stellt **2** eines der ersten Cyclopeptide dar, die bisher in der Arbeitsgruppe dargestellt wurden, dessen Anionenaffinität in reinem Wasser untersucht werden konnte.

Für die Bindungsstudien wurden verschiedene Techniken verwendet. Massenspektrometrische Analysen gaben Hinweise darauf, dass **2** 1:1 Komplexe mit Anionen, wie z.B. Sulfat oder Iodid, ausbildet. NMR spektroskopisch konnte gezeigt werden, dass die Anionen höchstwahrscheinlich in ähnlicher Weise an die NH-Gruppen des Cyclopeptids binden wie in bereits bekannten strukturell analogen Cyclopeptiden. Hinweise auf eine Beteiligung der  $\beta$ -Alaninseitenketten an der Anionenbindung wurden ebenfalls gefunden. Ob das Cyclopeptid im Sulfatkomplex die in Abb. 22 gezeigte, berechnete Konformation annimmt, konnte jedoch nicht eindeutig belegt werden. Mittels UV/Vis Spektroskopie wurde gezeigt, dass eine Protonierung der 6-Aminopicolinsäureuntereinheiten von **2** in saurer Lösung nicht stattfindet. Potentiometrisch wurde weiterhin ermittelt, dass **2** bereits bei pH 7 überwiegend in der vollständig protonierten Form vorliegt. Außerdem wurde die Sulfataffinität von **2** in 0.15 M NaCl-Lösung quantifiziert. Mit einer Bindungskonstanten von  $\log K_a = 2.77$  für die Wechselwirkung der dreifach protonierten Form von **2** mit einem Sulfatanion ist die Effizienz der Bindung unter diesen sehr kompetitiven Bedingungen signifikant.

Detaillierte Informationen zur Anionenbindung wurden mittels isothermer Titrationskalorimetrie erhalten. In diesem Zusammenhang wurde auch die Anionenaffinität von **2** mit der des (neutralen) Z-geschützten Derivats **20** verglichen. Dabei zeigte sich, dass **2** in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) mit 20 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  bei pH 4.8 Sulfatanionen mit einem  $\log K_a$  von 5.10 um mehr als eine Größenordnung stärker bindet als **20** in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) ( $\log K_a = 3.77$ ). Natriumtosylat dagegen wird von **20** stärker gebunden. So beträgt die Tosylataffinität von **20**  $\log K_a = 3.43$  in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) und von **2** in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) mit 20 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  bei pH 4.8  $\log K_a = 2.80$ . Dieses Ergebnis ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass nicht allein die zusätzlichen attraktiven Coulomb-Wechselwirkungen zu den gebundenen Anionen für die höhere Sulfataffinität von **2** verantwortlich sind, sondern spezifische Wechselwirkungen zwischen

Wirt und Gast, die möglicherweise auf einer Unterstützung der Sulfatbindung durch die Seitenketten beruhen, wie durch die berechnete Struktur in Abb. 22 angedeutet.

Die kalorimetrische Charakterisierung der Komplexbildung gab Hinweise auf die Anteile enthalpischer und entropischer Faktoren der Sulfatbindung. Cyclopeptid **2** zeigt auch in Wasser eine hohe Sulfataffinität, wobei sogar eine beachtliche Stabilität für den Sulfatkomplex von **2** bei pH 7 in Phosphatpuffer nachgewiesen wurde. Es handelt sich bei **2** also um einen Rezeptor, der das doppelt negativ geladene Sulfatanion mit hoher Selektivität bindet, während die Affinität für tetraedrische teilweise protonierte Anionen wie  $\text{HPO}_4^{2-}$  oder  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  deutlich geringer ist.

In der Natur findet man ein ähnliches Verhalten bei dem in der Einleitung vorgestellten Sulfat-bindenden Protein, welches Sulfat 50.000-mal stärker bindet als Hydrogenphosphat.<sup>[50]</sup> Die Ursache für diese Selektivität liegt darin, dass sich im aktiven Zentrum des SBP ausschließlich Wasserstoffbrückendonatoren befinden. Repulsive Wechselwirkungen mit einem teilweise protonierten Anion sind daher nicht vermeidbar. Im Gegensatz zum SBP enthält das Phosphat-bindende Proteine (PBP) im aktiven Zentrum einen Wasserstoffbrückenakzeptor in Form von Aspartat, so dass dieses effizient an Hydrogenphosphat binden kann.<sup>[51]</sup> Eine analoge Situation ergibt sich für **2**, da auch dieser Rezeptor lediglich Wasserstoffbrückendonoren für die Gastbindung zur Verfügung stellt.

Neben den Untersuchungen in Gegenwart von Phosphatsalzen zeigte sich, dass auch Chloridanionen die Sulfatbindung nicht in signifikantem Umfang beeinträchtigen: Selbst in 0.15 M NaCl-Lösung beträgt die Sulfataffinität  $\log K_a$  von **2** ungefähr 3, was unabhängig durch Potentiometrie und ITC bestätigt werden konnte.

Damit wurde mit **2** ein effizienter Sulfatrezeptor entwickelt, der selektiv Sulfatanionen in Wasser zu binden vermag. Es zeigt sich, dass die Kombination der Anionenbindungsstelle, die den in der Gruppe entwickelten anionenbindenden Cyclopeptiden gemeinsam ist, mit peripheren Seitenketten, die sich spezifisch an der Gastbindung beteiligen, eine geeignete Strategie darstellt, die Löslichkeits- und Bindungseigenschaften solcher Cyclopeptide gezielt zu verbessern.

### 2.6 Ausblick

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt, stellt Cyclopeptid **2** einen effizienten Rezeptor für die Bindung von Sulfat in wässrigem Medium dar. Allerdings ließ sich während meiner Untersuchungen nicht eindeutig nachweisen, ob auch die Halogenide von **2** komplexiert werden bzw. welche Stöchiometrie die gebildeten Komplexe aufweisen. So konnte ich im Massenspektrum ausschließlich 1:1 Komplexe mit Chlorid, Bromid und Iodid nachweisen. Mit diesem Modell ließen sich aber die Titrationskurven, die mittels ITC erhalten wurden, nicht anpassen. In folgenden Arbeiten sollte nun diese Problematik untersucht und währenddessen ermittelt werden, welche Stöchiometrie die gebildeten Komplexe besitzen und wie stark die Halogenide gebunden werden.

Aufbauend auf meinen Ergebnissen zur Sulfatbindung von **2** kann nun versucht werden, einen selektiven Sulfatsensor auf Basis dieses Cyclopeptids zu entwickeln, um praktische Anwendungen zu erschließen. Hierzu könnte das Cyclopeptid beispielsweise auf Goldoberflächen immobilisiert werden und elektrochemische oder gravimetrische Methoden für die Analytdetektion verwendet werden. Zunächst ist es hierfür erforderlich, ausgehend von **2** ein geeignetes Derivat herzustellen, das Ankergruppen für die Immobilisierung trägt.

### 3 Synthese und Untersuchung eines dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids)

#### 3.1 Einleitung

Ein weiteres Verfahren, um die Effizienz der Cyclopeptide als Anionenrezeptoren steigern zu können, besteht darin, den 2:1 Komplex von **1** in einen 1:1 Komplex zu überführen. Dies wurde durch kovalente Verbrückung zweier Cyclopeptidringe über einen Spacer, wie z.B. Adipinsäure, erreicht, der mit Hilfe von Molecular Modelling Studien identifiziert wurde (Abb. 45). Der Spacer verhindert dabei nicht, dass sich die beiden Cyclopeptidringe, wie im Iodidkomplex von **1**, kooperativ an der Anionenbindung beteiligen. Bindungsstudien zeigten, dass die Effizienz der Komplexbildung durch die Verbrückung zunimmt. Auf die Löslichkeit des Rezeptors hatte die Verbrückung der beiden Cyclopeptidringe allerdings einen ungünstigen Einfluss. So konnten Bindungsstudien mit dem Bis(cyclopeptid) **39** lediglich in 50 % Methanol/Wasser (v/v) oder 33 % Acetonitril/Wasser (v/v) durchgeführt werden.<sup>[48a,52]</sup> Die Sulfataffinität betrug in 33 % Acetonitril/Wasser (v/v)  $\log K_a = 5.30$ .<sup>[53]</sup>

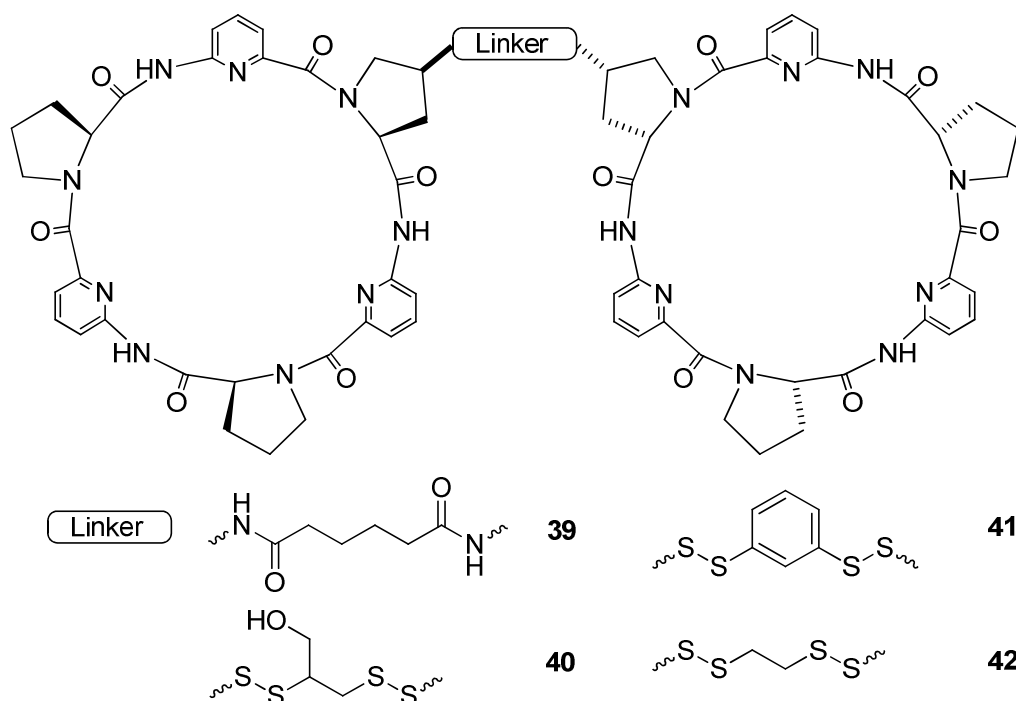


Abb. 45: Strukturen verschiedener einfach verbrückter Bis(cyclopeptide).

Weitere Linker für die Verbrückung zweier Cyclopeptidringe wurden mit Hilfe der dynamischen kombinatorischen Chemie identifiziert. Unter diesem Begriff versteht man eine



neuerer Strategie innerhalb der supramolekularen Chemie zur Identifizierung von Rezeptoren oder Substraten für natürliche oder synthetische Rezeptoren. Im ersten Fall wird eine Rezeptorbibliothek generiert, bei der sich alle Komponenten in einem dynamischen Gleichgewicht befinden, da der kovalenten Verknüpfung einzelner Rezeptorbausteine reversible Reaktionen zugrunde liegen. Durch Zugabe eines Templates, das mit einzelnen Verbindungen innerhalb der Bibliothek wechselwirkt, kann die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts gezielt beeinflusst werden. Man erwartet im Normalfall, dass das Templat den besten komplementären Rezeptor innerhalb der Bibliothek selektiert und das Gleichgewicht zugunsten der Bildung dieses Rezeptors verschiebt. Dieses Prinzip ist am Beispiel zweier konkurrierender Reaktionen, die zu den Produkten A und B führen, in Abb. 46 gezeigt. In Abwesenheit des Templates ist Produkt B das Hauptprodukt, da es stabiler ist als A. Das Templat bindet aber bevorzugt an A, stabilisiert dieses Produkt thermodynamisch und bewirkt letztlich, dass A dadurch zum Hauptprodukt wird.

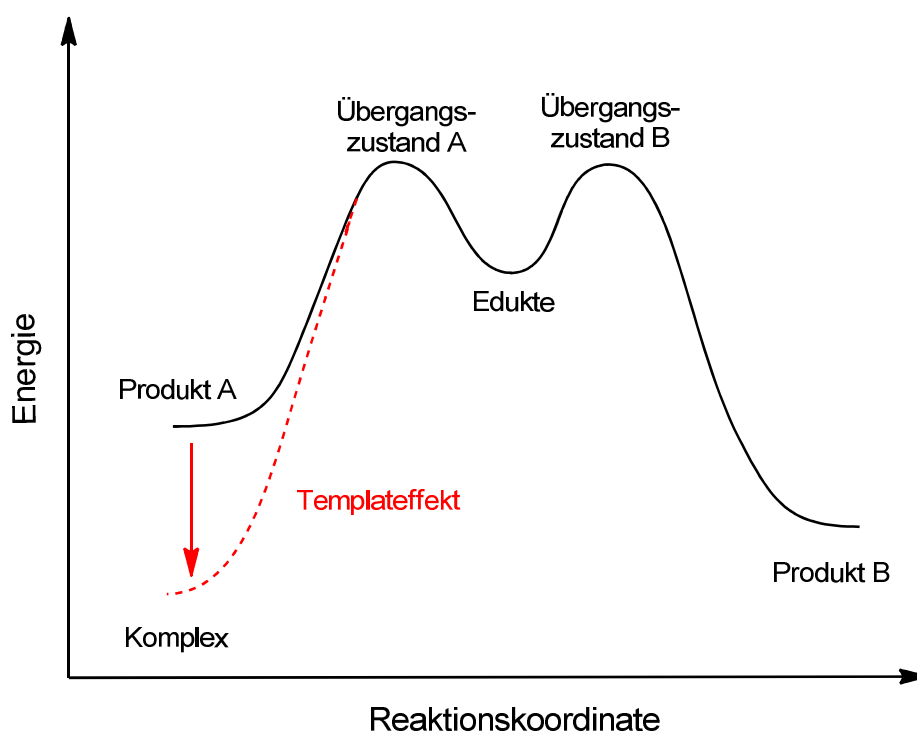
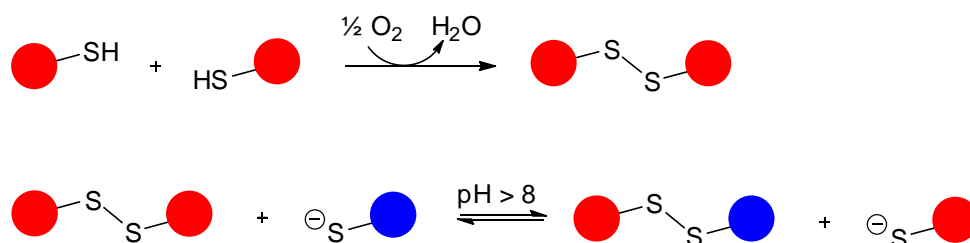


Abb. 46: Energiediagramm einer thermodynamisch kontrollierten Reaktion mit zwei konkurrierenden Reaktionswegen.

Diese Strategie eignete sich ebenfalls zur Identifizierung von Linkern zur Überbrückung zweier Einheiten von **1**.<sup>[53]</sup> Als reversible Reaktion wurde der Disulfidaustausch verwendet. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnten zwei weitere einfach verbrückte Bis(cyclopeptide)

**40** und **41** als potente Anionenrezeptoren identifiziert werden. Verbindung **40** enthält als Linker Dimercaprol und **41** Benzol-1,3-dithiol. Beide Cyclopeptide besitzen in Acetonitril/Wasser 2:1 (v/v) Sulfataffinitäten, die mit  $\log K_a$  (**40**) = 6.78 und  $\log K_a$  (**41**) = 6.83 die von **39** um eine Größenordnung übersteigen.<sup>[52]</sup>

Als Baustein diente in diesen Arbeiten ein Cyclopeptid mit einer 4*S*-konfigurierten 4-Thio-prolineinheit. Dieses wurde mit Dithiolen in Acetonitril/Wasser 2:1 (v/v) in Gegenwart von Natriumsulfat bei pH 8 – 9 äquilibriert. Unter diesen Bedingungen werden zunächst die Thiole durch Oxidation mit Sauerstoff in die entsprechenden Disulfide überführt. Weiterhin ermöglicht der pH-Wert, dass kontinuierlich nucleophile Angriffe von in geringeren Mengen vorhandenen Thiolatanionen an Schwefelatomen der gebildeten Produkte unter Bildung eines neuen Disulfids und Freisetzung eines Thiolats erfolgen (Schema 17). Erst bei Ansäuern der Lösung wird die Reaktion unterbrochen, da alle Thiolatanionen protoniert werden.



Schema 17 Bildung von Disulfiden und Disulfidaustausch.

Es ist zu berücksichtigen, dass die einfach verbrückten Bis(cyclopeptide) flexibel bezüglich der Rotation in den Linkerbindungen sind. Durch Einführen eines zweiten bzw. dritten Linkers zwischen den Cyclopeptiden wurde darum versucht, die konformelle Freiheit dieser Rezeptoren weiter eingeschränkt und deren Vororganisation für die Anionenbindung zu verbessern. Die Strukturen der mehrfach verbrückten Bis(cyclopeptide) sind schematisch in Abb. 47 dargestellt.

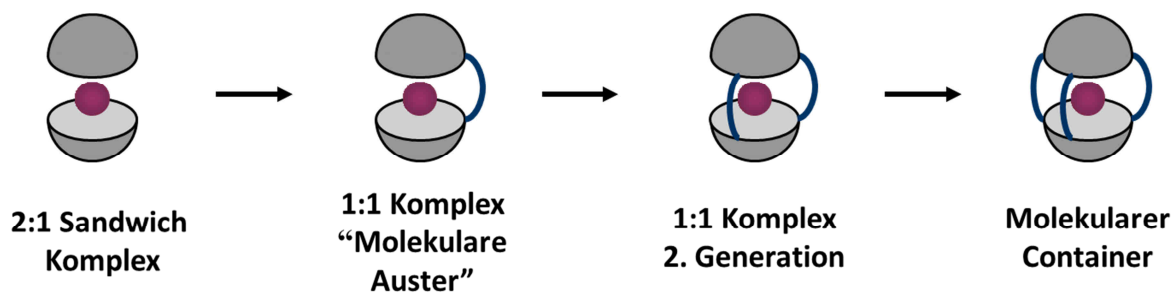


Abb. 47: Entwicklung der Anionenrezeptoren auf Cyclopeptidbasis.

Die Darstellung mehrfach verbrückter Bis(cyclopeptide) ist im Vergleich zu den einfach verbrückten Systemen schwieriger. Probleme stellen dabei die vielfältigen Reaktionswege bei Verwendung mehrfach funktionalisierter Cyclopeptide dar, welche z.B. neben den gewünschten Produkten auch zu linearen oder vernetzten Polymeren führen können. Eine geeignete Strategie, diese Probleme zu umgehen, stellt wiederum die Verwendung von reversiblen Reaktionen unter thermodynamischer Kontrolle zum Aufbau der Bis(cyclopeptide) dar. Treten bei diesen Reaktionen beispielsweise Fehler durch falsch verknüpfte Cyclopeptidringe auf, die aus kinetisch bevorzugten Reaktionswegen resultieren, können diese Fehler im Laufe der Zeit korrigiert werden. Da erwartet wird, dass ein Anionenkomplex der Bis(cyclopeptide) das thermodynamisch günstigste Produkt darstellt, sollte dieses in Anwesenheit geeigneter Anionen das Hauptprodukt darstellen auch wenn für dessen Bildung zwei bzw. drei Brücken zwischen den beiden Cyclopeptidringen auf korrekte Weise gebildet werden müssen.

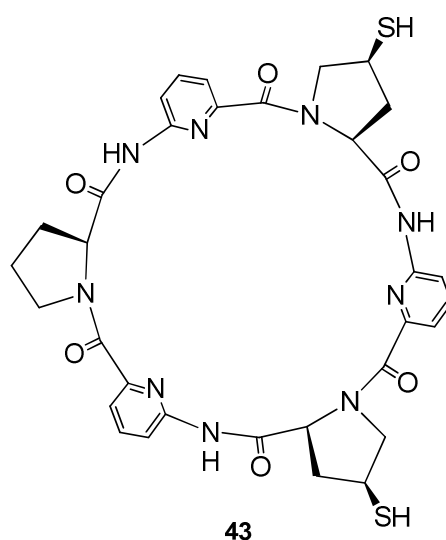


Abb. 48: Cyclopeptididissulfid **43**.

Die Synthese der Bis(cyclopeptide) der zweiten Generation erfolgte ausgehend von Cyclopeptididissulfid **43** (Abb. 48). Dieses Cyclopeptid **43** wurde in dynamischen Bibliotheken mit verschiedenen Dithiolen umgesetzt, die sich in der Länge und Flexibilität der Gruppen zwischen den beiden Thioleinheiten unterschieden.<sup>[54]</sup> Als Template wurden Iodid- sowie Sulfatsalze eingesetzt, da deren Anionen mit den Bis(cyclopeptiden) erfahrungsgemäß am stärksten wechselwirken.<sup>[48b]</sup>

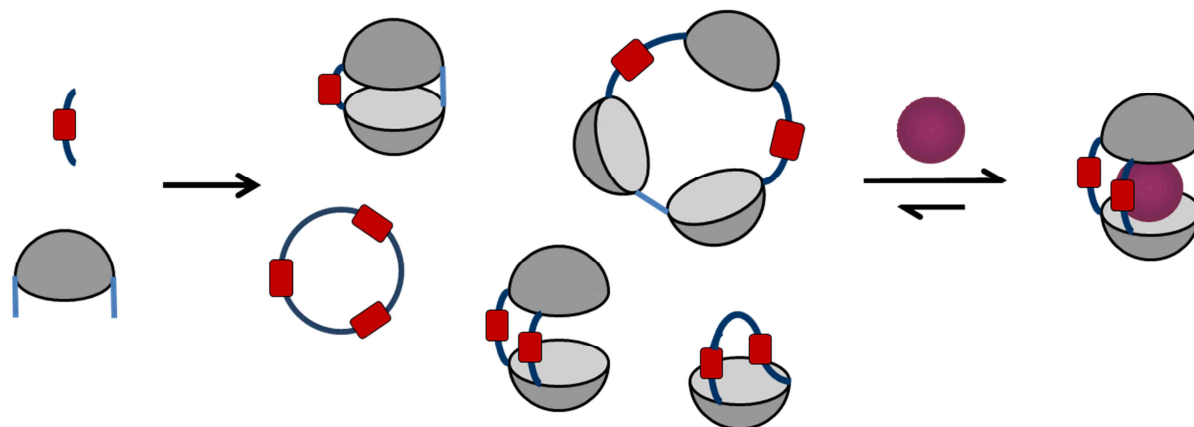


Abb. 49: Schematische Darstellung der Bildung eines zweifach verbrückten Bis(cyclopeptids) durch Templat-kontrollierte thermodynamische Reaktionsführung.

Als Produkte wurden in den Bibliotheken nur Bis(cyclopeptide) identifiziert, die zwei Linker gleicher Sorte enthielten. Die besten Linker waren wiederum jene, die bereits bei der Darstellung der einfach verbrückten Bis(cyclopeptide) identifiziert wurden. Dimercaprol wurde bei diesen Untersuchungen durch 1,2-Ethandithiol ersetzt, da es bei Verwendung des racemischen Dimercaprols zur Bildung schwer trennbarer Diastereomergemische kam. Die resultierenden Bis(cyclopeptide) sind in Abb. 50 dargestellt.

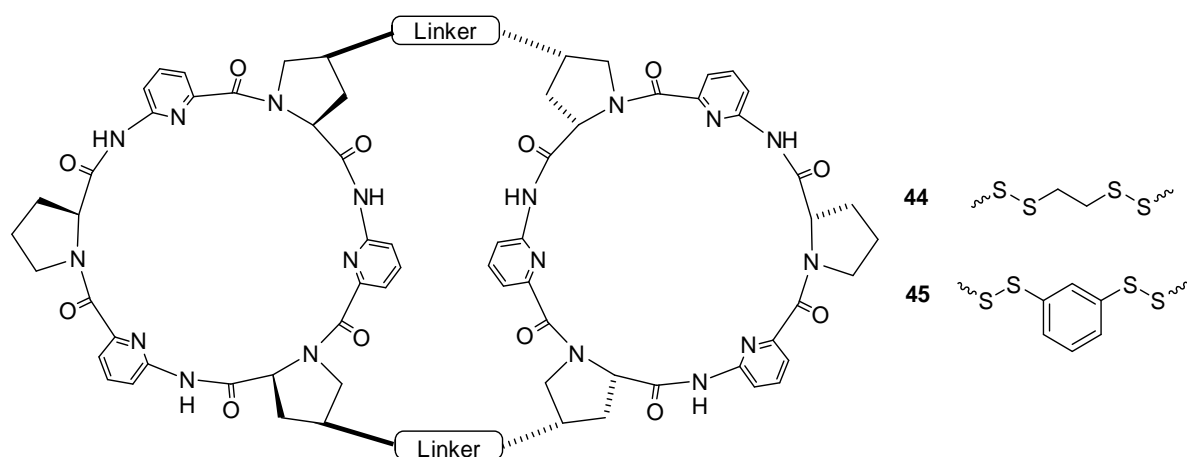
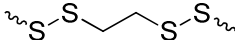
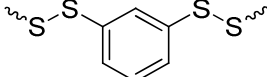


Abb. 50: Zweifach verbrückte Bis(cyclopeptide).

Die Bindungsaffinitäten der Rezeptoren **44** und **45** wurden mittels isothermer Titrationskalorimetrie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Sulfataffinität so hoch ist, dass eine direkte Quantifizierung nicht möglich war. Es wurde entsprechend eine kompetitive Titration durchgeführt, bei der die jeweiligen Iodidkomplexe der Bis(cyclopeptide) in Sulfatkomplexe

überführt wurden. Die vorher bestimmte Stabilität der Iodidkomplexe gestattete die Berechnung der Sulfataffinität. Die für die Sulfatkomplexe erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst, welche zum Vergleich auch die für die einfach verbrückten Bis(cyclopeptide) erhaltenen Ergebnisse enthält.

Tabelle 8 Thermodynamische Daten für die Sulfatkomplexe der Rezeptoren **41**, **42**, **44** und **45** in Acetonitril/Wasser 2:1 (v/v) bei 298.1 K.

Art Linker	Anzahl Linker	$\log K_a$	$\Delta G^\circ$ kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H^\circ$ kJ mol <sup>-1</sup>	$T\Delta S^\circ$ kJ mol <sup>-1</sup>
	1 <sup>[54]</sup>	6.78	-38.6	2.8	41.4
	2 <sup>[54]</sup>	8.67	-49.5	9.6	59.1
	1 <sup>[48b]</sup>	6.83	-39.0	3.7	42.7
	2 <sup>[54]</sup>	7.59	-43.3	6.0	49.3

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, besitzt das Bis(cyclopeptid) **44** mit zwei 1,2-Ethandithiollinkern eine nanomolare Affinität für Sulfat in wässrigen Lösungsmittelgemischen. Die Bindungskonstante ist die höchste, die bisher für einen neutralen Anionenrezeptor publiziert wurde.

Vergleicht man die thermodynamischen Daten der Sulfatkomplexe der verschiedenen Rezeptoren miteinander, so stellt man fest, dass die Bindungsenthalpie beim Übergang von einfach zu zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) ungünstiger wird. Die Zunahme der Bindungsaffinität ist also auf den Entropieterm zurückzuführen, der bei den beiden zweifach verbrückten Rezeptoren wesentlich günstiger ist als bei den entsprechenden einfach verbrückten. Weiterhin ist zu erkennen, dass die beiden einfach verbrückten Bis(cyclopeptide) unabhängig von der Linkerstruktur eine ähnliche Affinität zu Sulfatanionen aufweisen. Demgegenüber unterscheidet sich die Sulfataffinität der beiden zweifach verbrückten Bis(cyclopeptide) deutlich, wobei der Rezeptor **44** mit den flexibleren 1,2-Dithioethanlinkern einen stabileren Sulfatkomplex bildet als Rezeptor **46** mit den rigideren Benzol-1,3-dithiol-linkern. Dies wurde dadurch erklärt, dass **44** möglicherweise besser eine für die Sulfatbindung günstige Konformation annehmen kann.

Arbeiten zur Synthese eines dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) unter Verwendung einer analogen Strategie wurden in der Dissertation von E. Eugenieva-Illieva und in der vorliegenden Dissertation durchgeführt.<sup>[55]</sup> Ein dreifach verbrücktes Bis(cyclopeptid) wurde außerdem mittels dreifacher 1,3-dipolarer Azid-Alkin Cycloaddition (Huisgen-Cycloaddition) aus einem Cyclopeptidtriazid und einem Cyclopeptidtrialkin hergestellt.<sup>[56]</sup> Im Gegensatz zum Disulfidaustausch ist diese Reaktion irreversibel und die Produktbildung darum kinetisch kontrolliert. Durch den Zusatz eines Templates wird hierbei der Übergangszustand der Reaktion stabilisiert, der zu dem gewünschten Produkt führt (Abb. 51).

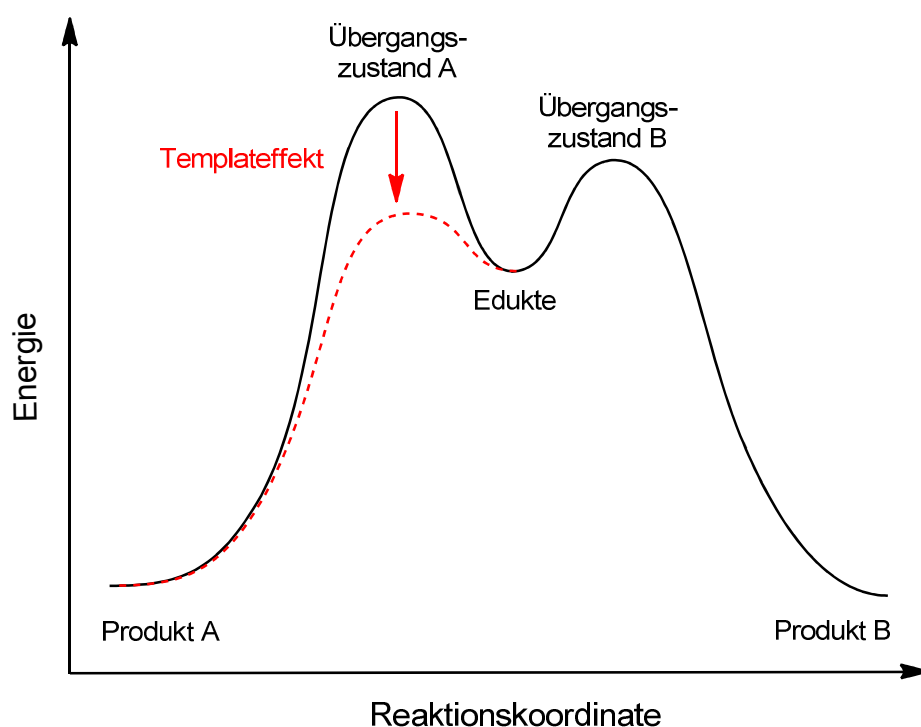


Abb. 51: Kinetische Reaktionskontrolle bei zwei konkurrierenden Reaktionswegen.

Es wurde erwartet, dass in dem Hohlraum eines dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) das Anion vollständig eingeschlossen ist und dadurch eine hohe Bindungsaffinität resultiert. In den Arbeiten zum Bis(cyclopeptid), das durch 1,3-dipolare Cycloaddition erhalten wurde, wurden neben dem dreifach verbrückten Bis(cyclopeptid) **47** zu Vergleichszwecken auch das entsprechende Bis(cyclopeptid) mit nur einem Linker **46** synthetisiert (Abb. 52). Die Bestimmung der Sulfataffinität beider Verbindungen erfolgte mittels isothermer Titrationskalorimetrie in Methanol/Wasser 1:1 (v/v). Überraschenderweise zeigte sich, dass trotz der vermeintlich besseren Vororganisation, Bis(cyclopeptid) **47** Sulfatanionen nur ca. eine Größenordnung stärker bindet als **46**. So wurde für den Sulfatkomplex von **46** eine Bindungs-

konstante von  $\log K_a = 5.0$  und für **47** eine Bindungskonstante von  $\log K_a = 5.7$  ermittelt. Auffallend war weiterhin, dass die Komplexbildung von **47** im Gegensatz zu der von **46** endotherm verläuft. Als Grund hierfür wurde einerseits eine ungünstige Vororganisation von **47** für die Sulfatbindung identifiziert. Die konformative Umorganisation des Rezeptors während der Komplexbildung verursacht wahrscheinlich Spannungen in den Linkern, die die Komplexbildung enthalpisch benachteiligen. Weiterhin zeigten die Untersuchungen, dass **47** sehr stark an Wassermoleküle bindet. Die Freisetzung dieser Wassermoleküle erfordert Energie, die durch die Komplexbildung vermutlich nicht überkompensiert wird.

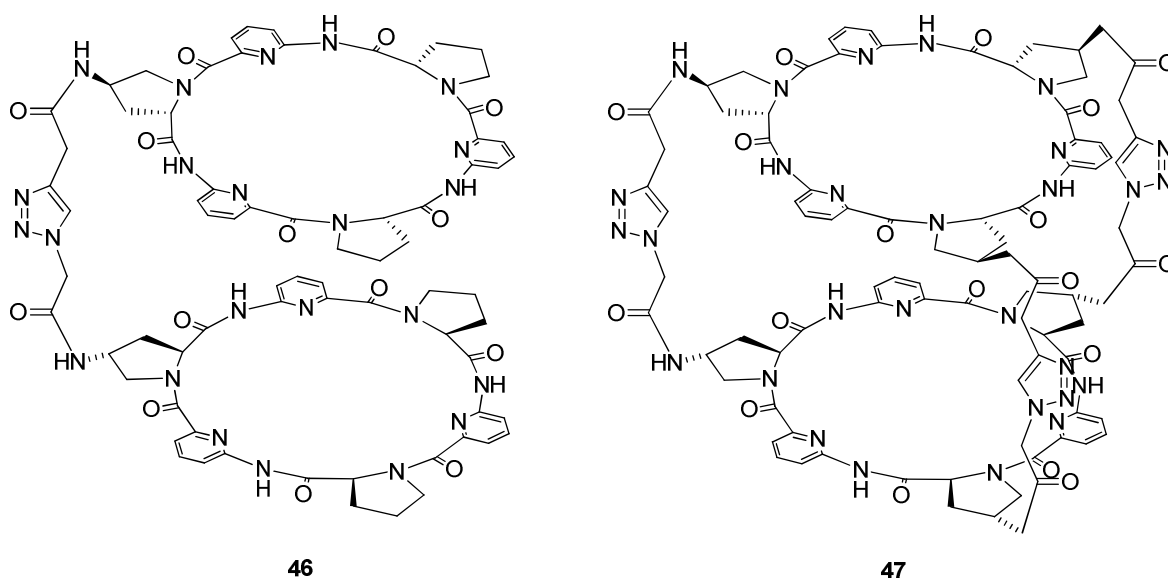


Abb. 52: Über Triazoleinheiten verbrückte Bis(cyclopeptide) **46** und **47**.

Diese Untersuchungen zeigen, wie wichtig die Wahl der Linker in solchen Bis(cyclopeptiden) ist. Die falsche Linkerwahl kann die Bindungsaffinität negativ beeinflussen, auch wenn der Hohlraum des Rezeptors, in dem die Substratbindung stattfindet, eigentlich vom umgebenden Lösungsmittel gut abgeschirmt ist. In diesem Zusammenhang besitzt die dynamisch kombinatorische Chemie den großen Vorteil, dass die Linker „vom System selber“ auf Basis der thermodynamischen Stabilität der Komplexe, an denen man interessiert ist, selektiert werden. Mit diesem Verfahren sollte es daher eher gelingen, hochaffine Anionenrezeptoren zu identifizieren. Die Arbeiten zu den einfach und zweifach verbrückten, durch Disulfidaustausch generierten Bis(cyclopeptide) liefern diesbezüglich vielversprechende Hinweise

### 3.2 Aufgabenstellung

Ausgehend von Thiol-funktionalisierten Cyclopeptiden konnten in vergangenen Arbeiten bereits einfach sowie zweifach verbrückte Bis(cyclopeptide) als Anionenrezeptoren erhalten werden.<sup>[52,48b,54]</sup> Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte auf Basis dieser und vorangegangener, von E. Eugenieva-Ilieva durchgeführter Arbeiten außerdem ein über Disulfidbindungen dreifach verbrücktes Bis(cyclopeptid) synthetisiert werden.<sup>[55]</sup> Aufgrund der thermodynamischen Kontrolle, unter der diese Synthese durchgeführt wird, ist damit zu rechnen, dass hochaffine Anionenrezeptoren zugänglich sind. Im Unterschied zu den von Cram beschriebenen Carceranden oder Hemicarceranden<sup>[57]</sup> würden die von Cyclopeptid **1** abgeleiteten Kapseln mit den NH Gruppen nach innen ragende Bindungsstellen besitzen und die Komplexe sollten daher auch thermodynamisch und nicht nur kinetisch stabilisiert sein.<sup>[58]</sup>

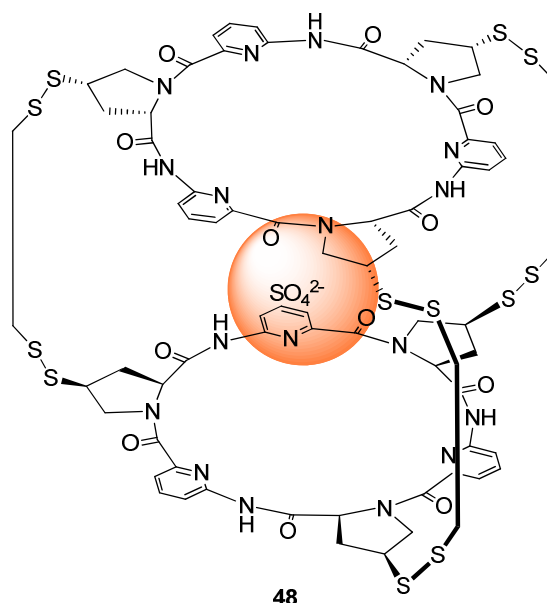


Abb. 53: Bis(cyclopeptid) bestehend aus zwei Cyclopeptidringen, die über drei 1,2-Ethandithiollinker verbrückt sind.

Zielverbindung war Bis(cyclopeptid) **48**, das bereits in der Arbeit von E. Eugenieva-Ilieva als Anionenrezeptor identifiziert werden konnte.<sup>[55]</sup> Die drei 1,2-Ethandithiollinker scheinen wie in den entsprechenden einfach und zweifach verbrückten Analoga eine für die Anionenbindung besonders günstige Anordnung der beiden Cyclopeptidringe zu induzieren. Im Rahmen meiner Arbeit sollte die Synthese und Isolierung von **48** verbessert und anschließend Bindungsstudien mit diesem Bis(cyclopeptid) durchgeführt werden.



### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Syntheseoptimierung

Für die Synthese eines dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) mittels Reaktionsführung unter thermodynamischer Kontrolle und Verwendung des Disulfidaustausches als reversibler Reaktion wurde das Cyclopeptid **49** mit drei Thiol-funktionalisierten Prolinuntereinheiten benötigt (Abb. 54).

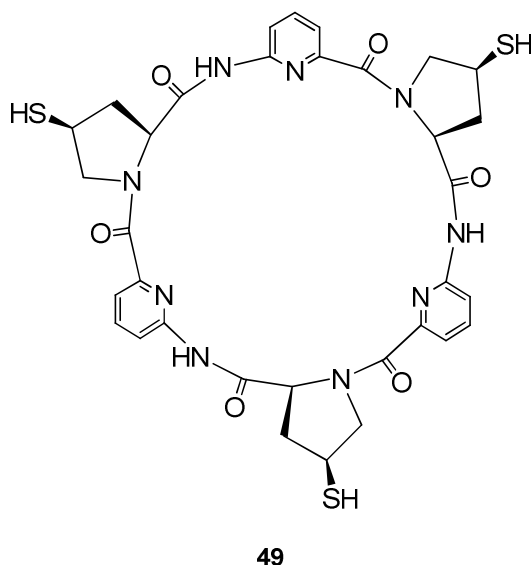
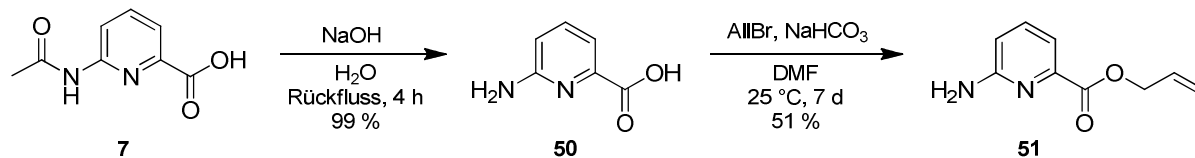


Abb. 54: Cyclopeptidtrithiol **49** als Baustein für den Aufbau eines dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids).

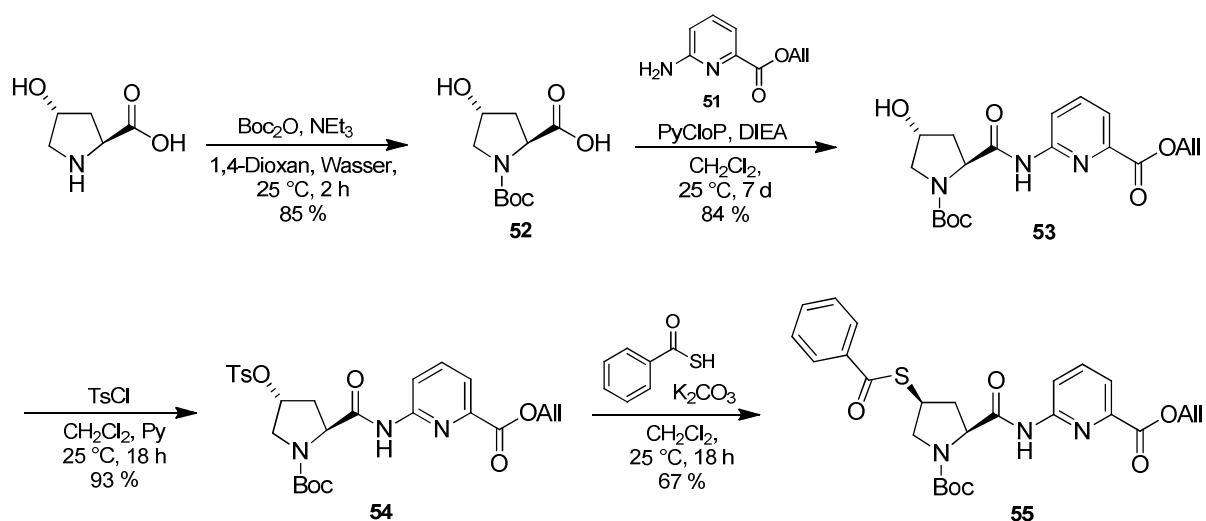
Die Synthese von **49** basiert auf konventioneller Peptidsynthese in Lösung. Dabei wird als zentraler Baustein ein geeignet geschütztes Derivat der sich wiederholenden Dipeptideinheit in **49** benötigt. Dieses Dipeptid wird zum linearen Tetra- und Hexapeptid kettenverlängert. Im letzten Schritt erfolgt dann die Cyclisierung unter Pseudohochverdünnung. Konkret wurde als Baustein das Dipeptid **55** eingesetzt, in dem das N-terminale Ende durch eine Boc-Schutzgruppe und das C-terminale Ende durch einen Allylester geschützt ist. Die Thiolgruppe an der Prolineinheit trägt eine Benzoylgruppe. Die Boc-Gruppe kann unter trockenen sauren Bedingungen und der Allylester durch Palladium(0)-Katalyse abgespalten werden. Unter beiden Bedingungen ist, wie C. Reyheller in seiner Dissertation zeigen konnte,<sup>[54]</sup> die Thio-benzoylgruppe stabil. Die Spaltung dieser Gruppe erfolgt durch Methanolyse im letzten Schritt der Synthese unter milden basischen Bedingungen. Der Aufbau des Aminopicolinsäurebausteins mit der Allylschutzgruppe ist in Schema 18 dargestellt.

Ausgehend von der bereits in Kapitel 2 vorgestellten *N*-Acetyl-6-aminopicolinsäure **7** wurde zunächst die Acetyl-Schutzgruppe abgespalten und schließlich die Carbonsäure mit Hilfe von 3-Brompropen zum Allylester **51** verestert.



Schema 18 Synthese des 6-Aminopicolinsäureallylesters.

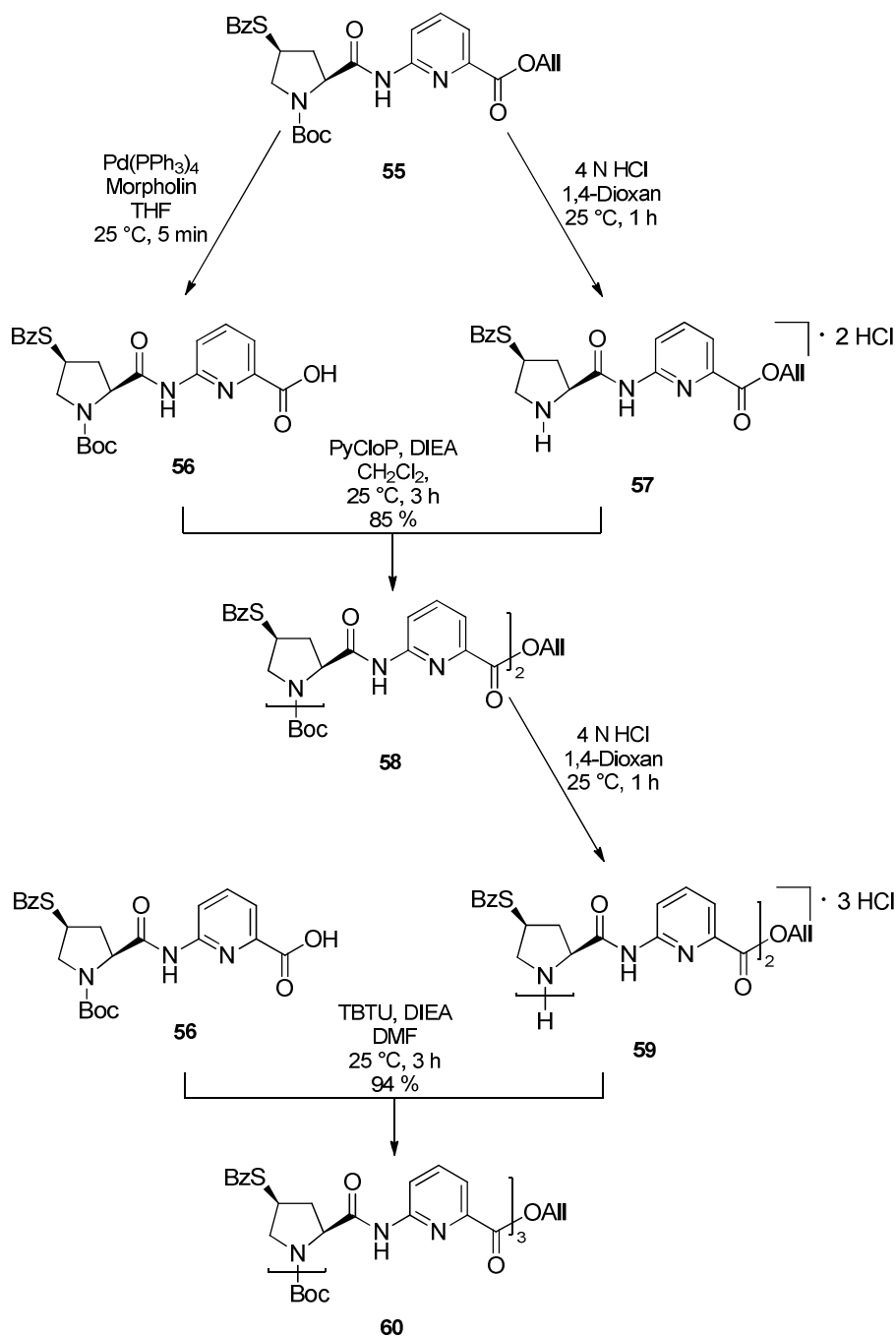
Für die Synthese von **55** wurde zunächst die Aminogruppe von L-Hydroxyprolin mit einer Boc-Schutzgruppe versehen. Das erhaltene Produkt wurde dann mit 6-Aminopicolinsäureallylester unter Verwendung von PyCloP als Kupplungsreagenz zum Hydroxyprolinhaltigen Dipeptid gekuppelt. Die Hydroxygruppe wurde tosyliert und schließlich erfolgte die Umsetzung mit Thiobenzoat, bei der in einer nucleophilen Substitution unter Inversion des Stereozentrums am C( $\gamma$ )-Atom das vollständig geschützte, funktionalisierte Dipeptid **55** generiert wurde (Schema 19).



Schema 19 Synthese des Dipeptidbausteins **55**.

In einer sequentiellen Synthese wurde nun das Cyclopeptid aus dem Dipeptid **55** aufgebaut. Dazu wurde **55** Boc-entschützt und der Allylester einer äquivalenten Menge von **55** mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in Anwesenheit von Morpholin gespalten (Schema 20). Die beiden entschützten Dipeptide wurden zum Tetrapeptid **58** gekuppelt. Das so erhaltene Tetrapeptid **58** wurde durch Behandlung mit HCl in wasserfreiem 1,4-Dioxan am N-

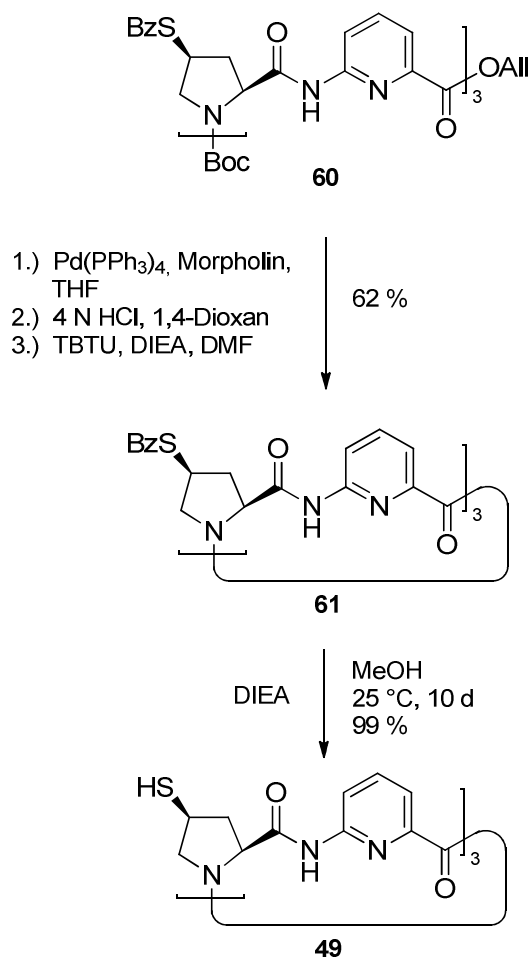
Terminus entschützt und mit dem C-terminal entschützten Dipeptid **56** zum linearen Hexapeptid **60** gekuppelt.



Schema 20 Synthese des linearen Hexapeptids **60**.

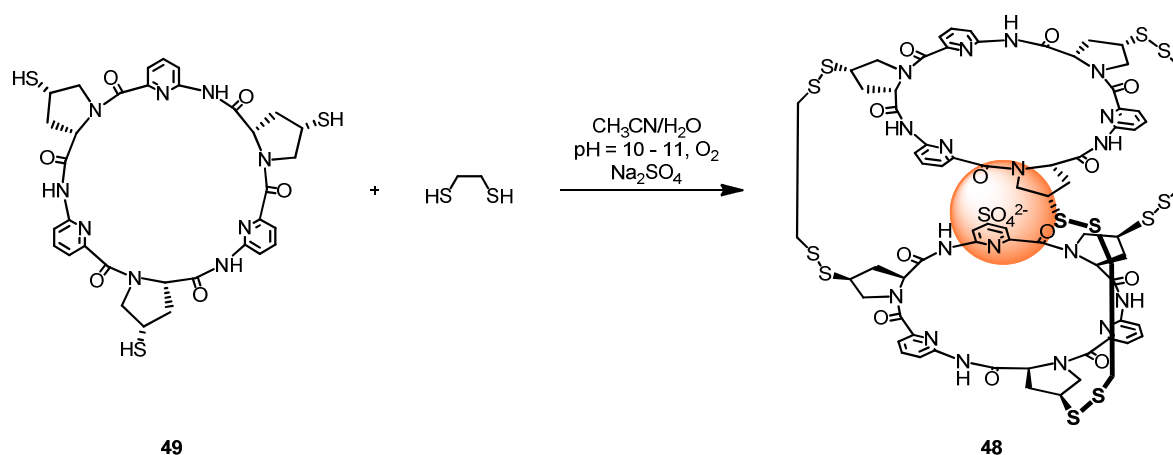
Für die Umsetzung zum Cyclopeptid wurde zunächst die Schutzgruppe am C-Terminus abgespalten und dann die Boc-Schutzgruppe entfernt. Die Cyclisierung erfolgte unter Pseudohochverdünnung, indem das vollständig entschützten linearen Hexapeptid langsam zu einer Mischung aus TBTU und DIEA in entgastem DMF gegeben wurde (Schema 21). Die

Ausbeute dieser Ringschlussreaktion war im Vergleich zu Ausbeuten von Synthesen anderer cyclischer Peptide mit typischerweise 62 % erfreulich hoch. Im letzten Schritt wurden schließlich die Benzoyl-Schutzgruppen an den Thiogruppen durch Behandlung mit DIEA in trockenem Methanol entfernt. Das so erhaltene Cyclopeptidtrithiol **49** wurde ohne weitere Aufreinigung für die Bis(cyclopeptid)-Synthese eingesetzt.



Schema 21 Darstellung des Thiol-funktionalisierten Cyclopeptids **49**.

Im Falle der Synthesen von einfach bzw. zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) wurden die jeweiligen Cyclopeptidbausteine zusammen mit den als Linkern verwendeten Dithiolen in Acetonitril/wässriger NaOH (pH ca. 11) gelöst, mit Natriumsulfat als Templatsalz versetzt und bei Raumtemperatur in Gegenwart von Sauerstoff gerührt.<sup>[54]</sup> Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC verfolgt.



Schema 22 Darstellung des dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) **48**.

Die Synthese von **48** wurde von E. Eugenieva-Ilieva im Rahmen ihrer Dissertation erstmals untersucht.<sup>[55]</sup> Nach ihren Ergebnissen kann eine Bildung von **48** nur beobachtet werden, wenn die Reaktionsmischung 5 equiv Dithiothreitol (DTT) enthält, einem Reagenz, das zur reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken dient.<sup>[59]</sup> Dieser Befund wurde darauf zurückgeführt, dass das Cyclopeptid **49** bei Spaltung der Thiobenzoate nicht als Monomer anfällt, sondern als Gemisch, das neben dem Monomer auch Dimere, Trimere und höhere Oligomere von **49** enthält, welche aus der Oxidation der Thiolgruppen zu Disulfiden hervorgehen. E. Eugenieva-Ilieva vermutete, dass diese Oligomere nicht an der Gleichgewichtseinstellung teilnehmen und deren Cyclopeptideinheiten daher nicht in das Produkt überführt werden können. Es erschien daher von Vorteil, zu Beginn der Reaktion alle Disulfide zunächst durch Reduktion mit DTT in Thiole zu überführen.

Die von E. Eugenieva-Ilieva für die Synthese von **48** verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Auffallend sind die großen Mengen an Templat und DTT. Die Aufarbeitung des Produktes erfolgte durch präparative HPLC mit einem Acetonitril/Wasser-Gradient. Auf diese Weise konnte E. Eugenieva-Ilieva das Produkt jedoch nur in unbefriedigender Reinheit von 60 – 70 % isolieren. Als Verunreinigungen waren wahrscheinlich nicht näher charakterisierte anorganische Salze enthalten, die weder im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum noch massenspektrometrisch eindeutig charakterisiert werden konnten.

Tabelle 9 Von E. Eugenieva-Ilieva verwendete Bedingungen der Synthese von **48**. Die Konzentration von **49** betrug während der Synthese 1.32 mM.

	Äquivalente in Bezug auf <b>49</b>
DTT / equiv	5
1,2-edt / equiv	1.5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / equiv	5.4

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich verschiedene Aspekte in der bestehenden Synthese von **48** erneut adressiert, wobei ich mich zunächst mit den Reaktionsbedingungen befasst habe. Die Analyse der Reaktionen erfolgte mit Hilfe der analytischen HPLC. In Abb. 55 sind zwei Chromatogramme von Reaktionsmischungen zu Beginn und nach Beendigung der Reaktion abgebildet. Die entsprechenden Signale konnten eindeutig über die MALDI-TOF Massenspektrometrie zugeordnet werden. So entspricht das Signal bei ungefähr 9 min in dem Chromatogramm zu Beginn der Reaktion dem Startmaterial **49**. In dem Chromatogramm nach drei Tagen sind insbesondere zwei Peaks relevant. Der Peak bei ca. 17.5 min entspricht dem dreifach verbrückten Bis(cyclopeptid) **48** während der kleinere bei etwas höheren Retentionszeiten einem Bis(cyclopeptid) zugeordnet werden kann, dass vier Linkereinheiten zwischen den beiden Cyclopeptidringen enthält.

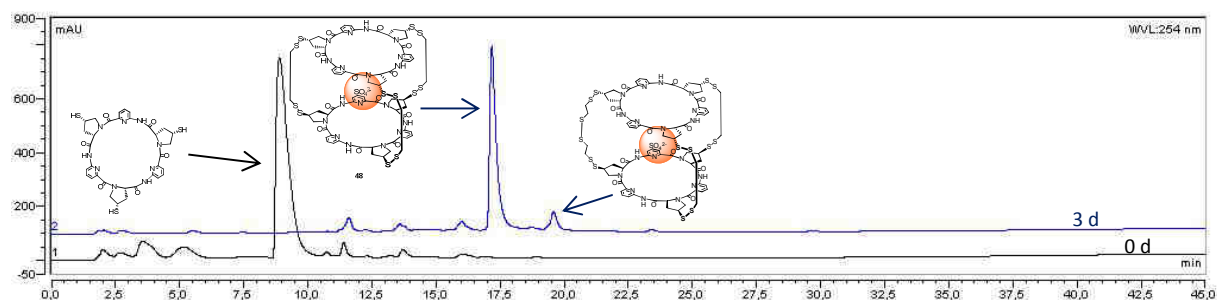


Abb. 55: Vergleich der Chromatogramme der Reaktionslösung nach 0 und nach 3 Tagen.

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob der Zusatz von DTT während der Synthese notwendig ist. Hierfür wurden sechs Reaktionen durchgeführt. Die Bedingungen dieser Ansätze entsprachen bis auf die Menge an DTT denen, die E. Eugenieva-Ilieva für die Synthese von **48** verwendete (Tabelle 9). Die Zugabemenge an DTT wurde zwischen 0 und 5 equiv variiert. Die Chromatogramme der Reaktionslösungen nach zwei Tagen sind in Abb. 56 gezeigt. In

allen Chromatogrammen sind im Wesentlichen zwei Peaks sichtbar, die den oben bereits beschriebenen Produkten entsprechen.

Die Chromatogramme zeigen, dass die Zugabe von DTT die Reaktion kaum beeinflusst und eine effiziente Produktbildung auch in Abwesenheit von DTT zu beobachten ist. Damit scheint, entgegen den Ergebnissen von E. Eugenieva-Ilieva, ein Zusatz von DTT in der Reaktion nicht notwendig zu sein.

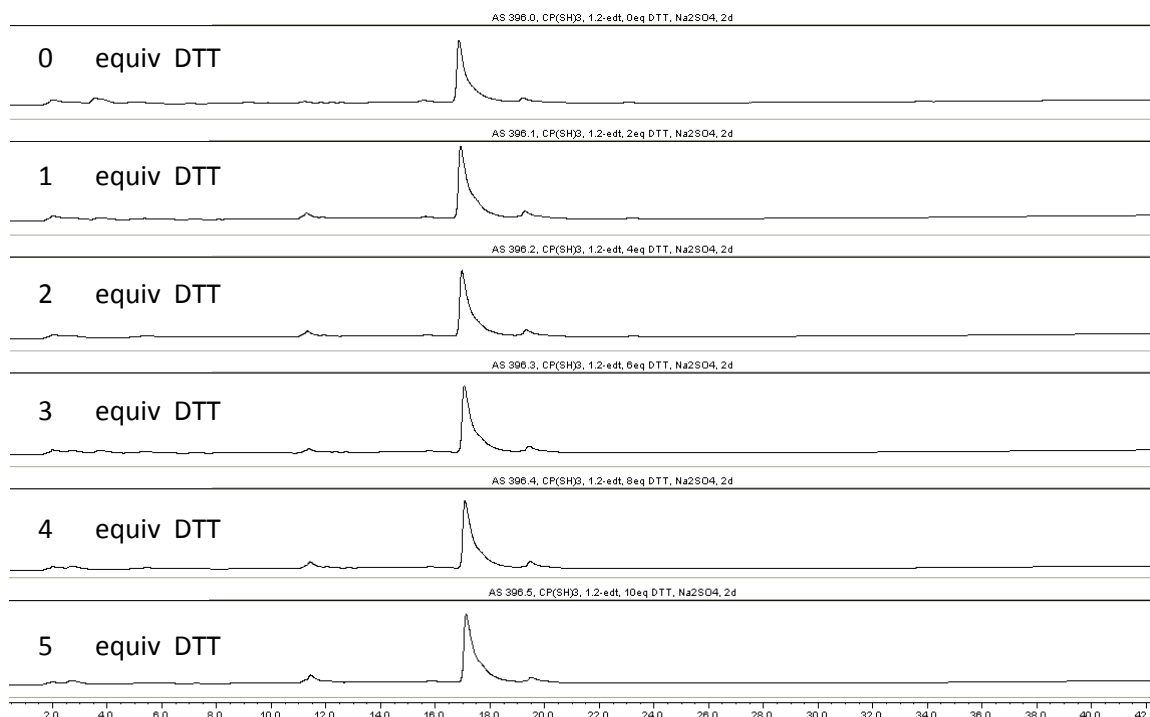


Abb. 56: Zusammensetzung der Reaktionsmischungen der Synthese von **48** bei Variation der zugegebenen Menge an DTT.

Es muss erwähnt werden, dass dieses Ergebnis zwar verschiedentlich reproduziert werden konnte, jedoch auch Synthesen unter denselben Bedingungen durchgeführt wurden, bei denen nach zwei Tagen keinerlei Produktbildung beobachtet wurde. Eine Ursache für diese Beobachtung wurde bisher nicht gefunden. In diesen Fällen konnte die Reaktion durch Zugabe von 1 equiv DTT eingeleitet werden. Nach zwei weiteren Tagen Reaktionszeit entsprach die Zusammensetzung der Reaktionsmischung dann den in Abb. 56 gezeigten. DTT scheint also für die Reaktion nicht immer notwendig zu sein, der Zusatz von DTT erhöht aber die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Als nächstes wurde nun die Linkermenge optimiert. Hierfür wurden ebenfalls sechs Reaktionen unter den in Tabelle 9 angegebenen Bedingungen angesetzt und die Menge des

zugegebenen 1,2-Ethandithiols zwischen 1.5 und 15 equiv bezogen auf die Cyclopeptidmenge variiert, wobei 1.5 equiv genau der Menge entsprechen, die für die Bildung eines dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) mindestens benötigt wird. Auf den Zusatz von DTT wurde verzichtet, da sich bei der ersten Untersuchung gezeigt hatte, dass dieses für die Reaktion nicht benötigt wird. Die in Abb. 57 gezeigten Chromatogramme zeigten, dass die Menge des Linkers ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Reaktionslösungen hat.

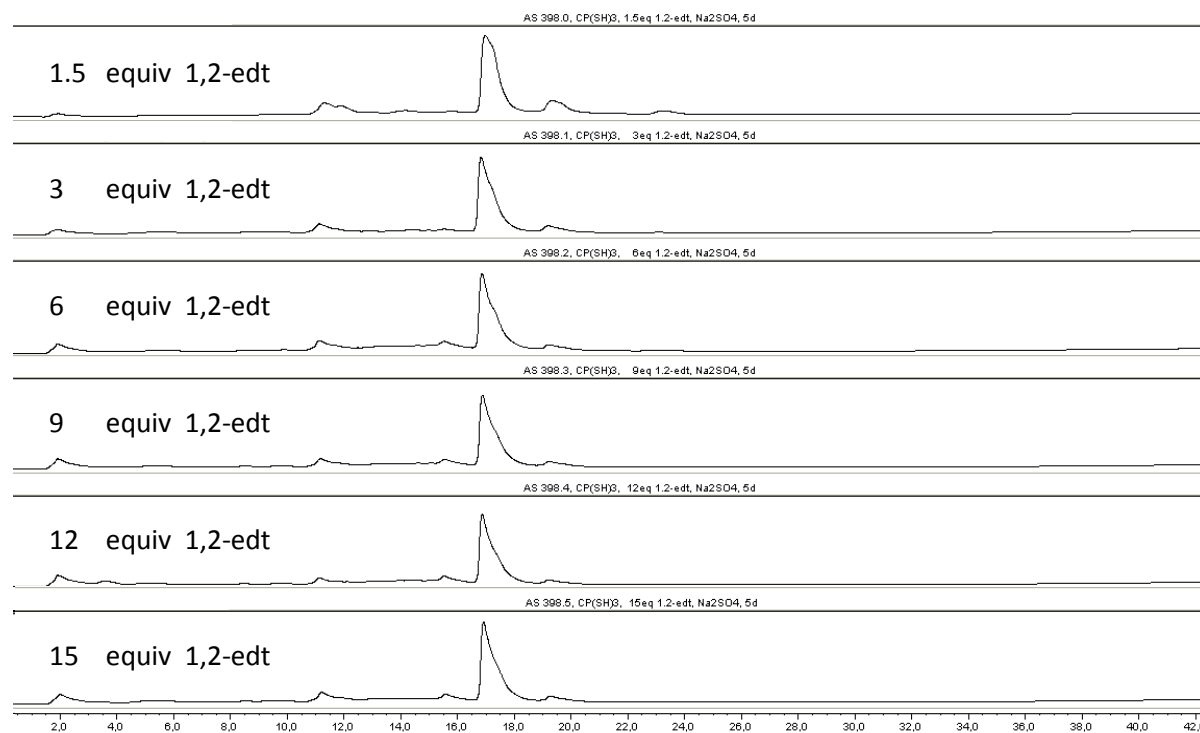


Abb. 57: Zusammensetzung der Reaktionsmischungen der Synthese von **48** bei Variation der zugegebenen Menge an Linker.

Mit bloßem Auge war jedoch erkennbar, dass mit zunehmender Menge an Linker die Reaktionslösungen zunehmend trüber wurden. Dieser Umstand ist auch in Abb. 59 erkennbar. Eine zu große Menge an Linker ist also ungünstig und die minimal nötige Linkermenge reicht für eine effiziente Reaktion aus. Um zu gewährleisten, dass für die Reaktion immer genügend Linkermoleküle vorliegen wurde ein Zusatz von 1.75 equiv Linker als optimal angesehen.



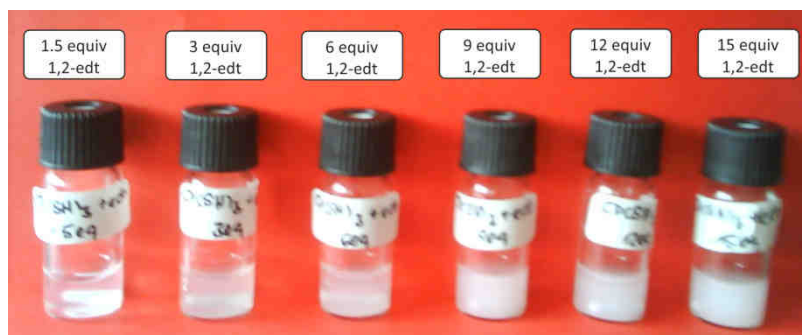


Abb. 58: Niederschlag in den Bibliotheken bei verschiedenen Linkerzusätzen.

Nach Variation der Dithiolmenge sollte nun der Einfluss des Templates auf die Reaktion untersucht werden. Hierfür wurde die Templatmenge zwischen 0.5 und 20 equiv variiert. Die Chromatogramme in Abb. 59 zeigen, dass mit steigender Menge Natriumsulfat die Intensität des Peaks bei einer Retentionszeit von 11 min zunimmt. Dieser Peak entspricht vermutlich einem Nebenprodukt aus einer Einheit Cyclopeptid **49** und mehreren Linkern. Entsprechend sollte ein Überschuss des Templates in der Reaktion vermieden werden.

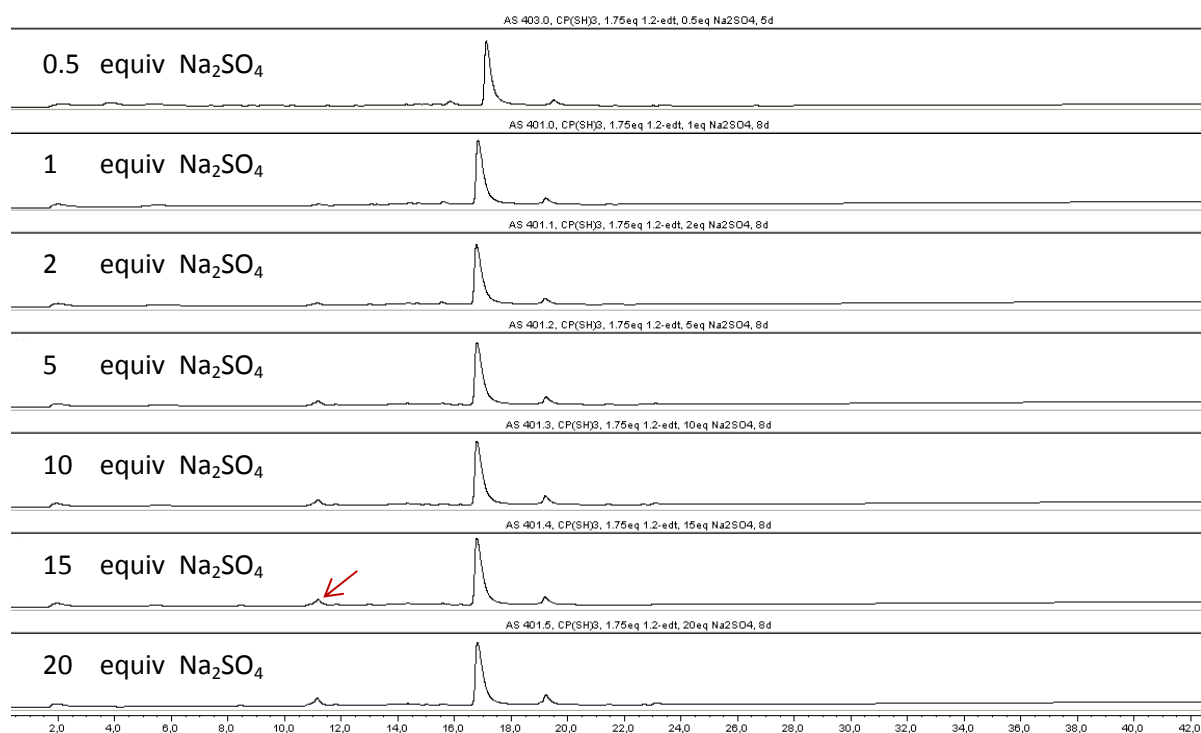


Abb. 59: Zusammensetzung der Reaktionsmischungen der Synthese von **48** bei Variation der zugegebenen Menge an Templat (Natriumsulfat).

Eine letzte Optimierung befasste sich mit der Änderung der Ausgangskonzentration von **49**. Allerdings wurde hier keine systematische Variation sondern lediglich Reaktionen mit der

ursprünglichen Konzentration von 1.32 mM sowie der halbierten Konzentration von 0.66 mM angesetzt und miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang wurde auch die Templatmenge minimal variiert. Einmal wurden 0.5 equiv und bei den anderen Ansätzen 1 equiv Natriumsulfat zugegeben. Den Chromatogrammen der Reaktionen bei geringerer Cyclopeptidkonzentration kann man entnehmen, dass der Peak bei einer Retentionszeit von ungefähr 15 min signifikant kleiner ist als bei den anderen beiden Ansätzen (Abb. 60). Daher wurde die Konzentration der Reaktion auf 0.66 mM festgelegt.

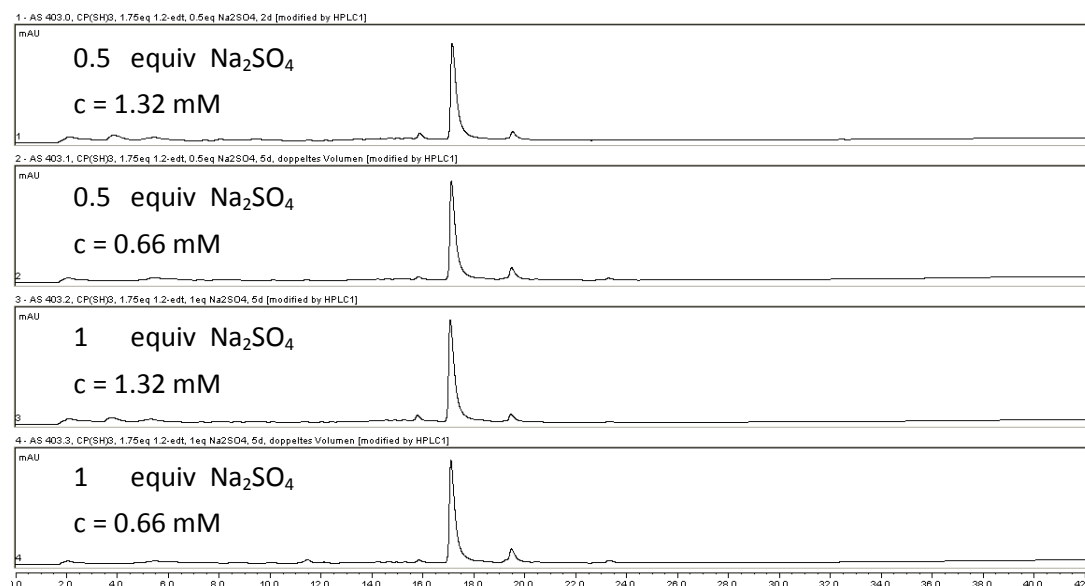


Abb. 60: Zusammensetzung der Reaktionsmischungen der Synthese von **48** bei Variation der zugegebenen Menge an Templat (Natriumsulfat).

Durch die systematische Variation der Reaktionsbedingungen in der Synthese von **48** konnten also Bedingungen identifiziert werden, unter denen das Produkt innerhalb von 2 – 3 Tagen effizient gebildet und die Bildung von Nebenprodukten etwas zurück gedrängt wird. Insbesondere wurden, im Vergleich zu denen von E. Eugenieva-Ilieva verwendeten Bedingungen, die Reagenzmengen verringert und es konnte sogar völlig auf ein Reagenz, nämlich DTT, verzichtet werden. Dadurch sollte auch die Aufarbeitung von **48** erleichtert werden. Die von mir erarbeiteten Bedingungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Zum Vergleich sind auch die von E. Eugenieva-Ilieva für die Synthese von **48** verwendeten Bedingungen angegeben.

Tabelle 10 Gegenüberstellung der Bedingungen für die Synthese von **48**.

	optimierte Bedingungen	ursprüngliche Bedingungen
DTT / equiv	0	5
1,2-edt / equiv	1.75	1.5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / equiv	0.75	5.4
Ausgangskonzentration von <b>49</b> / mM	0.66	1.32

Im nächsten Schritt wurde nun ein verbessertes Verfahren zur Aufarbeitung und Reinigung von **48** erarbeitet. Bei den von E. Eugenieva-Ilieva verwendeten Reinigungsverfahren wurden Nebenprodukte, Edukte und Salze mittels semi-präparativer HPLC von dem gewünschten Produkt **48** abgetrennt. Als Eluens wurde ein Acetonitril/Wassergemisch verwendet. Weiterhin enthielt das Lösungsmittel Natriumsulfat und Trifluoressigsäure, wobei diese Zusätze die Schärfe der Peaks in den Chromatogrammen verbesserten. Auf diese Weise wurde der Natriumsulfatkomplex von **48** isoliert. Überschüssige Salze wurden nach dem Einengen der Produktfraktionen durch sorgfältiges Waschen mit Wasser abgetrennt.

Eine Isolierung des freien Rezeptors **48** gelang nicht, da Voruntersuchungen von E. Eugenieva-Ilieva zeigten, dass aufgrund der hohen Anionenaffinität von **48** eine vollständige Abtrennung des gebundenen Sulfats außerordentlich schwierig und gleichzeitig mit der Einlagerung anderer Anionen in den Hohlraum des Rezeptors verbunden ist. Um ein einheitliches Produkt zu erhalten, wurde daher auf die Abtrennung von Natriumsulfat verzichtet.

Obwohl das von E. Eugenieva-Ilieva erhaltene Produkt laut <sup>1</sup>H-NMR Spektrum, HPLC Analyse und Massenspektrum keinerlei Verunreinigungen enthielt, zeigten <sup>1</sup>H-NMR spektroskopische Studien, bei denen eine definierte Menge des Salzes eines quaternären Ammoniumions zu der Probe zugesetzt und charakteristische Signale des Rezeptors und des Salzes integriert wurden, dass die Reinheit des erhaltenen Produkts lediglich 60 – 70 % betrug. Es wurde vermutet, dass es sich bei den Verunreinigungen um anorganische Salze handelt, die spektroskopisch und massenspektrometrisch nicht nachweisbar sind.

Erfahrungen in der Gruppe von S. Otto deuten darauf hin, dass diese Verunreinigungen auf Reaktionen von Acetonitril in Gegenwart von TFA auf RP-Säulen zurückzuführen ist.<sup>[60]</sup> Ich

beschloss daher, für die chromatographische Reinigung von **48** ein Wasser/Methanol Gemisch zu verwenden. Hierfür entwickelte ich einen geeigneten Lösungsmittelgradienten, wobei die Elution wie bei den Arbeiten von E. Eugenieva-Ilieva unter Zusatz von Natriumsulfat und TFA zum Lösungsmittelgemisch erfolgte. Nach der chromatographischen Trennung wurden diejenigen Produktfraktionen vereinigt, die **48** laut HPLC Analyse mit einer Reinheit von > 98 % enthielten. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in Methanol/Wasser 2:1 (v/v) gelöst und das Produkt durch langsames Verdampfen des Lösungsmittels auskristallisiert. Durch die Anwesenheit von Natriumsulfat aus dem Eluens wurde das Bis(cyclopeptid) **48** auf diese Weise ebenfalls als Sulfatkomplex isoliert.

Der erhaltene Feststoff wurde anschließend auf seine Reinheit überprüft. Dafür wurde ein  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **48** in Gegenwart einer definierten Menge Tetramethylammoniumsulfat aufgenommen. Durch Bestimmung des relativen Verhältnisses der Signale des Salzes und von **48** wurde die Reinheit von **48** quantifiziert. Hierbei ergab sich, dass **48** in im Rahmen der Genauigkeit der Messmethode in hoher Reinheit (> 95 %) isoliert wurde (Abb. 61). Durch den Wechsel von Lösungsmittel Acetonitril zu Methanol wurden also die in den Arbeiten von E. Eugenieva-Ilieva beobachteten Probleme behoben. Nichtsdestotrotz erkennt man im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum noch kleine Signale in Nachbarschaft zu den Signalen des Cyclopeptids, die auf Verunreinigungen schließen lassen, welche sich von dem Produkt **48** strukturell ableiten.

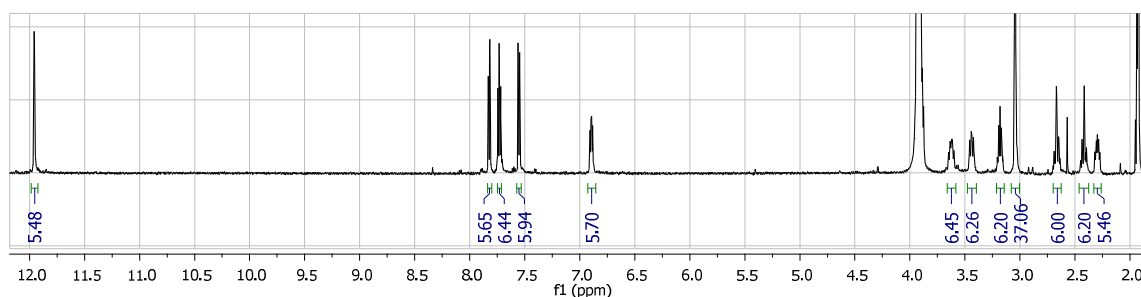


Abb. 61:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **48** in Anwesenheit von 1.5 equiv  $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$ .

Nach erneuter Analyse des isolierten Sulfat-Komplexes von **48** zeigte sich in dem HPLC Chromatogramm in der Tat ein weiterer Peak bei einer Retentionszeit von ungefähr 15 min und einem Gehalt von ungefähr 15 %, der unmittelbar nach der präparativen HPLC bei Analyse der Produktfraktionen noch nicht beobachtet wurde. Die LC-MS Analyse des Produktgemisches zeigte, dass das gebildete Nebenprodukt mit 939.2  $m/z$  eine um 8 Einheiten höhere Masse besitzt als das gewünschte Produkt (Abb. 62). Da es sich bei diesen Signalen, wie auch das Isotopenmuster zeigt, um doppelt geladene Ionen handelt, ist das Nebenprodukt

also 16 Masseneinheiten schwerer als **48**. Die in dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **48** sichtbaren Signale der Verunreinigung zeigen alle charakteristischen Protonen des Bis(cyclopeptids).

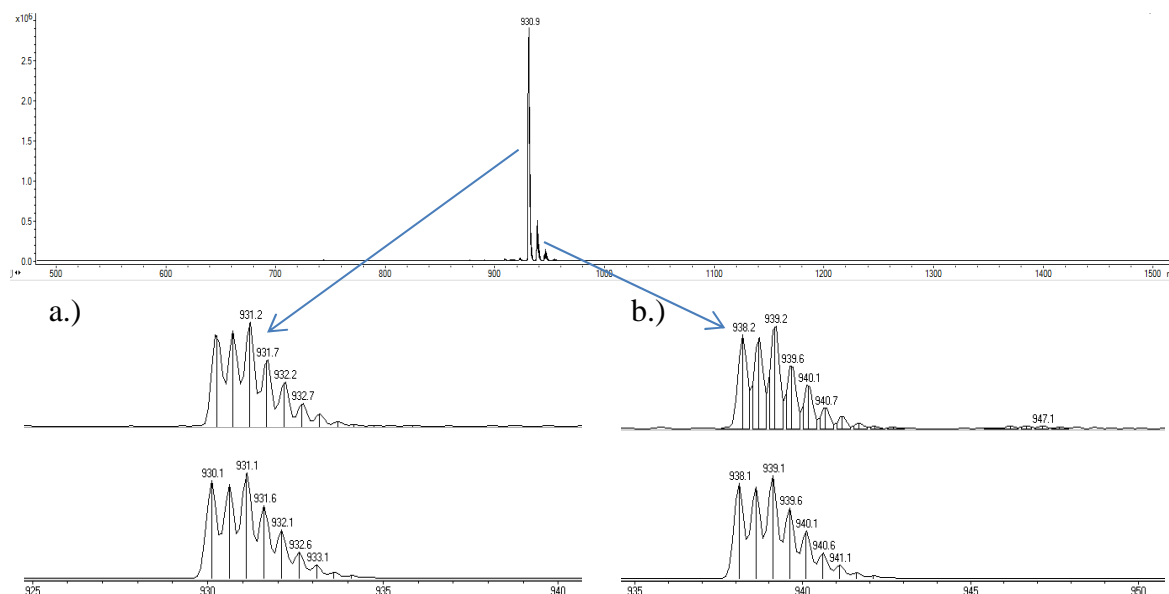


Abb. 62: Massenspektrum des Produktgemisches von **48**  
a.) ESI-MS Signal von **48** inkl. des simulierten Spektrums,  
b.) ESI-MS Signal des Nebenproduktes inkl. der Simulation.

Aus diesen Befunden wurde geschlossen, dass es sich bei der Verunreinigung um ein Oxidationsprodukt von **48** handelt. Dieses Resultat wurde ebenfalls durch das simulierte Spektrum des Nebenproduktes gestützt, da sich das experimentell erhaltene und das simulierte Isotopenmuster entsprechen (Abb. 62). Vermutlich wurde eine Disulfidbrücke zu einer Thiosulfonatgruppe oxidiert. Mögliche Strukturen des Oxidationsproduktes sind in Abb. 63 dargestellt. Im LC-MS Spektrum waren neben dem einfach oxidierten noch höher oxidierte Nebenprodukte mit jeweils Massendifferenzen von acht sichtbar (Abb. 63). Diese lagen jedoch nur in geringer Menge vor und wurden daher nicht weiter untersucht.

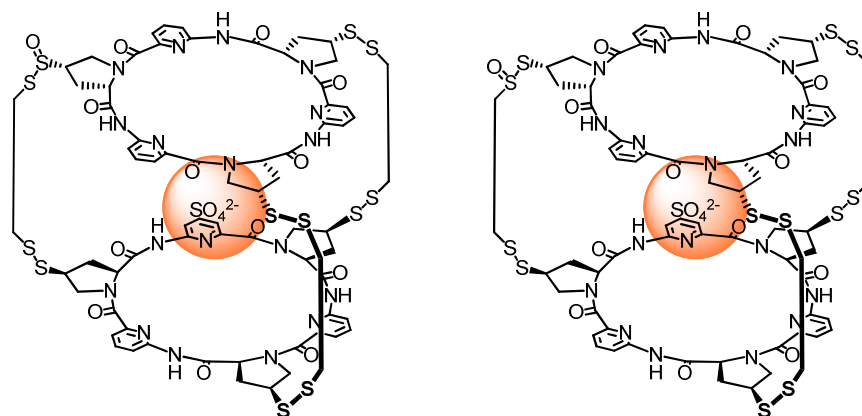


Abb. 63: Mögliche Strukturen des gebildeten Nebenproduktes.

Da das Oxidationsprodukt unmittelbar nach der chromatographischen Aufarbeitung nicht nachgewiesen werden konnte, entsteht es erst während der Aufarbeitung des Produkts. Eine chromatographische Verfolgung der einzelnen Aufarbeitungsschritte zeigte, dass das Nebenprodukt erstmals nach der Aufkonzentrierung des Produkts bei Entfernen des Lösungsmittels, v.a. des Wasseranteils nachzuweisen ist. Trotz mehrerer Versuche konnte dieser Schritt im Rahmen der Arbeit nicht so gestaltet werden, dass eine Oxidation ausblieb. Bisher ist die genaue Ursache der Oxidation unklar. Synthesen von Thiosulfinaten sind seit 1947 bekannt,<sup>[61]</sup> jedoch ist stets der gezielte Zusatz eines Oxidationsmittels, wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ , notwendig.<sup>[62]</sup> Allerdings wurde kürzlich bei der Synthese von über Disulfidgruppen verbrückten Bis(cyclodextrinen) ebenfalls über eine Überoxidation berichtet.<sup>[63]</sup> Bei der Identifizierung eines Rezeptors für Spermin mittels dynamischer kombinatorischer Chemie und Disulfidaustausch beschrieb auch die Otto Gruppe Probleme, die auf die Bildung von Thiosulfinaten zurückgeführt wurde.<sup>[64]</sup>

Der endgültige Strukturbeweis von **48** konnte mit Hilfe unseres Kooperationspartner K. Rissanen (Department of Chemistry, University of Jyväskylä, Finnland) erbracht werden. Diesem gelang es, Bedingungen zu identifizieren, **48** als Komplex mit Natriumsulfaten zu kristallisieren, wobei er hierfür das Gemisch von **48** mit dem Oxidationsprodukt verwendete. Von den erhaltenen Kristallen konnte eine Kristallstrukturanalyse erhalten werden, deren vorläufiges Ergebnis in Abb. 64 dargestellt ist. Man erkennt, dass der Komplex eine annähernd  $C_3$ -symmetrische Geometrie besitzt, in dem die Disulfidbrücken einen Ring um den von den beiden Cyclopeptidringen aufgespannten Hohlraum bilden und so den Gast abschirmen. Das Sulfatanion wird über insgesamt neun Wasserstoffbrücken zu den Amid-NH Gruppen gebunden, die in Abb. 64 als gestrichelte Bindungen dargestellt sind. Drei von den

vier Sauerstoffatomen werden über jeweils zwei Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Cyclopeptidringen gebunden während das vierte insgesamt drei Wasserstoffbrücken zu den drei NH Gruppen eines Cyclopeptidringes ausbildet und so in der durch die NH Gruppen aufgespannten Ebene liegt.

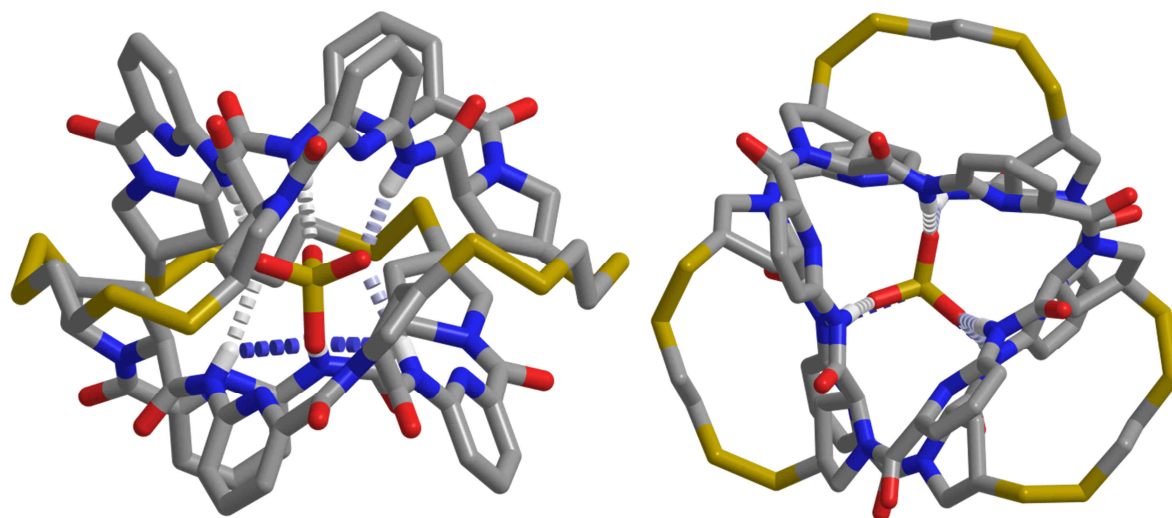


Abb. 64: Kristallstrukturanalyse des Sulfat- Komplexes von **48** als Stäbchenmodell, Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Die Bildung der Oxidationsprodukte aus **48** konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht wirkungsvoll unterdrückt werden. Damit wurde zwar die synthetische Zugänglichkeit von **48** verbessert und es wurde ein chromatographisches Verfahren entwickelt, **48** in deutlich höherer Reinheit zu erhalten als in der vorangegangenen Arbeit, vollkommen reines Bis(cyclopeptid) **48** wurde aber nicht erhalten. Aus diesem Grund wurden auch nur wenige Bindungsstudien mit dem erhaltenen Material durchgeführt.

### 3.3.2 Bindungsstudien

Das in Abb. 61 gezeigte  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **48** zeigt bei 11.98 ppm das Signal der NH Protonen des Bis(cyclopeptids). Trotz der Verwendung eines erheblichen Anteils Deuteriumoxid im Lösungsmittelgemisch ist der H/D-Austausch an den NH Gruppen von **48** offensichtlich langsam. Diese Beobachtung unterscheidet **48** von allen bisher im Arbeitskreis untersuchten Cyclopeptiden und Bis(cyclopeptiden), bei denen in  $\text{D}_2\text{O}$  Gemischen die NH Protonen aufgrund eines schnellen H/D-Austausches im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum nie zu beobachten waren. Die Ursache für den verlangsamten H/D-Austausch bei **48** ist vermutlich

die Abschirmung der NH Protonen von den Lösungsmittelmolekülen im Hohlraum des Bis(cyclopeptids), in dem sich ein Sulfatanion befindet. Um Informationen über die Dynamik der Komplexbildung zu erhalten, wurde die Geschwindigkeit des H/D-Austausches quantifiziert.

Hierzu wurde die Veränderung der  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von drei Proben von **48** in  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  1:2 (v/v) zeitabhängig verfolgt, wobei die eine zusätzlich 0.1 equiv und die anderen 0.6 bzw. 1.1 equiv Natriumsulfat enthielten. Es wurde jeweils das Integral des Signals für die NH Protonen ermittelt und in Relation zu dem Integral dieses Signals zu Beginn der Messung gesetzt. Aus der Auftragung von  $\ln[\int \text{NH} / \int \text{NH}_0]$  gegen die Zeit ergab sich eine Gerade aus der gemäß  $\ln[\int \text{NH} / \int \text{NH}_0] = -k_{ps} \cdot t$  die Geschwindigkeitskonstante des H/D Austausches unter der Annahme eines Zeitgesetzes pseudo-erster Ordnung berechnet werden konnte. Aus diesem Wert ergibt sich gemäß  $t_{1/2} = \ln 2 / k_{ps}$  auch die Halbwertszeit der Reaktion. Als Beispiel ist in Abb. 65 das Ergebnis der Messung in Gegenwart von 0.1 equiv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gezeigt.

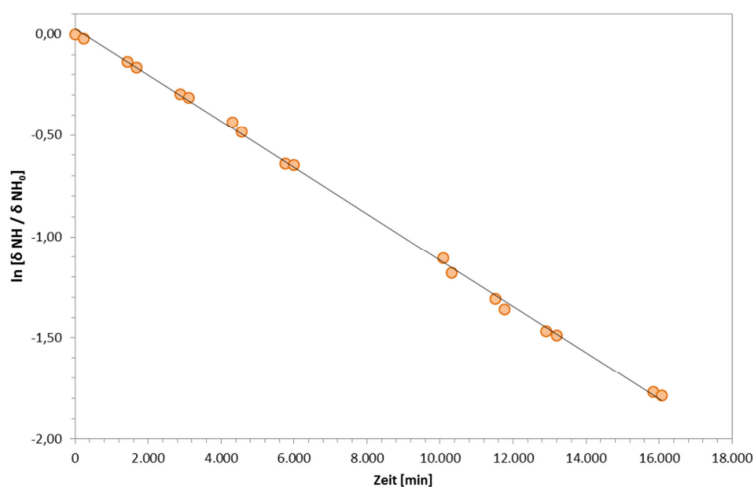


Abb. 65: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten in Anwesenheit von 0.1 equiv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Die in den drei Messungen erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Aus der Tabelle kann man ersehen, dass die Geschwindigkeit des H/D-Austausches mit steigendem Sulfatgehalt der Lösung abnimmt.



Tabelle 11 Geschwindigkeitskonstante sowie Halbwertszeit des H/D-Austausches in Gegenwart von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

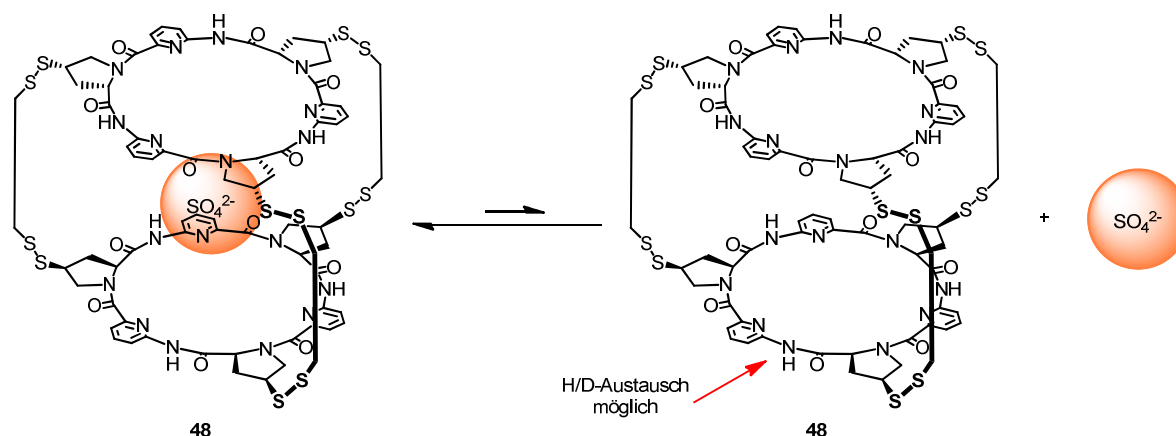
	Anteil Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
	0.1 equiv	0.6 equiv	1.1 equiv
$k_{ps} / \text{min}^{-1}$	$1.143 \cdot 10^{-4}$	$2.348 \cdot 10^{-5}$	$1.019 \cdot 10^{-5}$
$t_{1/2} / \text{d}$	4.21	20.50	47.24

### 3.4 Diskussion

Mit Hilfe meiner systematischen Untersuchungen ist es mir gelungen, die Reaktionsbedingungen für die Synthese von **48**, wie sie von E. Eugenieva-Ilieva entwickelt wurden, so zu modifizieren, dass nicht nur die eingesetzten Mengen an Reagenzien auf ein Mindestmaß reduziert wurden, sondern auch gänzlich auf die Zugabe von DTT verzichtet werden konnte. Des Weiteren wurde die Aufreinigung des Bis(cyclopeptids) so umgestellt, dass statt Acetonitril bei der chromatographischen Reinigung über eine RP-Säule Methanol eingesetzt wurde, da es in vorigen Arbeiten bei der herkömmlichen Aufreinigung zur Bildung nicht näher charakterisierter Nebenprodukte kam. Erste Analysen der Reinheit des erhaltenen Produkts zeigten, dass **48** auf diese Weise in einer Reinheit von > 95 % isoliert werden konnte. Die anschließende Untersuchung über HPLC-MS ergab allerdings, dass es während der Aufreinigung zu einer Oxidation eines Teils des Produktes (ca. 15 %) gekommen war. Über die Gründe, warum die Oxidation von **48** stattfindet, kann im Rahmen dieser Arbeit nur gemutmaßt werden. Ein Grund könnten Spannungen in den drei Linkern von **48** sein, die durch Oxidation teilweise abgebaut werden.

NMR-Spektroskopische Untersuchungen im wässrigen Medium zeigten, dass die Geschwindigkeit des H/D-Austausches bei Erhöhung der Sulfatkonzentration in Lösung verlangsamt wird. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein Anionenaustausch in Lösung über den dissoziierten Komplex als Intermediat verläuft. Aufgrund der Struktur des Sulfatkomplexes ist es unwahrscheinlich, dass neben dem Sulfat-anion ein D<sub>2</sub>O Molekül im Hohlraum des Bis(cyclopeptids) **48** Platz findet. Für den H/D-Austausch muss der Sulfatkomplex also dissoziieren, damit D<sub>2</sub>O Moleküle in die Nähe der NH Gruppen des Bis(cyclopeptids) gelangen können (Schema 23). Das Ausmaß der Konzentration an freiem

(lösungsmittelgefüllten) Rezeptor hängt von der Stabilität des Sulfatkomplexes ab. Darüber hinaus wird die Lage des Komplexbil dungsgleichgewichts durch die Konzentration an freiem Substrat in Lösung beeinflusst: Je höher die Sulfatkonzentration, desto geringer die Konzentration an freiem Rezeptor. Aus diesem Grund sinkt die Geschwindigkeit des H/D-Austausches mit Zunahme der Sulfatkonzentration.



Schema 23 Gleichgewicht zwischen dem leeren Bis(cyclopeptid) und dem Sulfat-Komplex von **48**.

Analoge Untersuchungen führte E. Eugenieva-Ilieva im Rahmen ihrer Doktorarbeit durch. Sie beobachtete in Anwesenheit von 0.14 equiv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  eine Halbwertszeit für den H/D-Austausch von 16.5 d bzw. 37.0 d in Gegenwart von 1.86 equiv. Damit entsprechen ihre Ergebnisse qualitativ den in dieser Arbeit erhaltenen. Quantitativ gibt es aber deutliche Abweichungen. So war der H/D-Austausch des von mir isolierten Produkts in Gegenwart von 0.1 equiv Natriumsulfat viermal so schnell wie bei dem von E. Eugenieva-Ilieva isolierten Material in Gegenwart von 0.14 equiv Natriumsulfat. Eine Ursache für diese Abweichung könnte der unterschiedliche Reinheitsgehalt der Produkte sein. Letztlich ergibt sich aus dem Ergebnis aber die klare Notwendigkeit, weiter an der Aufreinigung von **48** und der Charakterisierung der Bindungseigenschaften dieser Verbindung zu arbeiten.

An dieser Stelle soll außerdem erwähnt werden, dass das NH Signal während des H/D-Austausches nicht nur kleiner wird, sondern zudem auch aufspaltet. Dieser Effekt ist in Abb. 66 als Entwicklung des NH-Signals (12.06 – 11.98 ppm) über die Zeit dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Signal des vollständig protonierten Rezeptors nach und nach verschwindet und durch stärker Tieffeld-verschobene Signale ersetzt wird, die im Laufe der Zeit zunächst größer und in der Folge dann wieder kleiner werden.

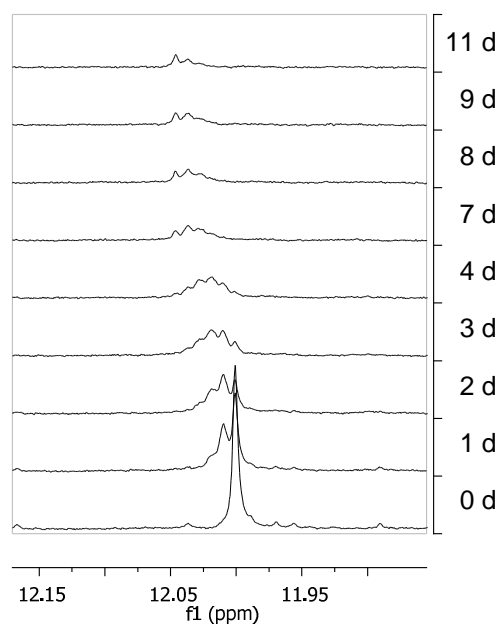


Abb. 66: Veränderung des Signals der NH-Protonen über die Zeit.

Es ist wahrscheinlich, dass die einzelnen Peaks, die in dem aufgespaltenen NH Signal beobachtet werden, die einzelnen Deuterierungsstufen von **48** widerspiegeln. D.h. für jede einzelne Rezeptorspezies mit null bis fünf Deuteriumatomen an den Amidstickstoffatomen ist als individueller Peak sichtbar. Die Tatsache, dass für jede dieser Spezies nur ein einzelnes Signal beobachtet wird deutet an, dass die verschiedene Anordnung der Deuteriumatome im Inneren von mehrfach deuterierten Bis(cyclopeptiden) in einem schnellen dynamischen Gleichgewicht ineinander übergehen. Der Tieffeldshift des Signals mit zunehmendem Deuterierungsgrad steht außerdem im Einklang mit Untersuchungen, in denen die Ionenpaarwechselwirkung in Ammoniumsalzen bei Deuterierung der  $\text{NH}_4^+$  Gruppe nach Abschirmung durch Kronenether und Cryptanden analysiert wurde.<sup>[65]</sup> Durch die Deuterierung wurde hier ebenfalls ein Tieffeldshift der NH Signale induziert, was auf die Verstärkung der verbleibenden Wasserstoffbrücken zurückgeführt wurde.<sup>[66]</sup> Ein ähnliches Verhalten zeigt sich auch bei dem Bis(cyclopeptid) **48**. Mit zunehmendem Deuterierungsgrad werden auch hier die Wasserstoffbrücken des Sulfatanions zu den NH Gruppen stärker und die zu den ND Gruppen schwächer.

#### 3.5 Zusammenfassung

Ich konnte während meiner Doktorarbeit durch systematische Variation der Reaktionsbedingungen die Synthese des dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) **48** vereinfachen, in dem die Zugabe an Reagenzien auf ein Mindestmaß reduziert wurde. So konnte völlig auf die Zugabe von DTT während der Reaktion verzichtet werden. Auch die Reinigung des Produktes mittels präparativer HPLC konnte im Rahmen der Arbeit verbessert werden, so dass anorganische Verunreinigungen in dem isolierten Produkt, im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorangegangenen Arbeiten, nun nicht mehr nachweisbar waren.

Während der Analyse des erhaltenen Produkts stellte sich allerdings heraus, dass das Bis(cyclopeptid) **48** bei der Isolierung an Luft teilweise oxidiert wird, so dass auch im Rahmen dieser Arbeiten kein reines Produkt isoliert werden konnte. Die Oxidation trat beim Einengen der chromatographisch erhaltenen Produktfraktionen auf, wobei der Gehalt an oxidiertem Produkt bis auf 15 % steigen konnte. Das Nebenprodukt wurde NMR spektroskopisch und mittels LC-MS Analyse nachgewiesen. An welcher Position und warum das Bis(cyclopeptid) bei der Aufreinigung oxidiert wurde konnte ihm Rahmen der Doktorarbeit nicht geklärt werden. Außerdem war es mir nicht möglich, die Nebenreaktion durch Veränderung der Aufreinigungsbedingungen zu verhindern.

Bei den Bindungsstudien wurden Ergebnisse von E. Eugenieva-Ilieva zum Sulfatkomplex von **48** qualitativ bestätigt. Zum einen wurde ein langsamer H/D-Austausch an den NH Gruppen von **48** im deuterierten, protischen Lösungsmittelgemisch Acetonitril/D<sub>2</sub>O 2:1 (v/v) nachgewiesen. Diese Eigenschaft des Sulfatkomplexes von **48** spricht für die Abschirmung der NH Gruppen im Innern des Hohlraums dieses Bis(cyclopeptids). Bei Erhöhung der Sulfatmenge im umgebenden Lösungsmittel sinkt die Geschwindigkeit des H/D-Austausches, was dafür spricht, dass der H/D-Austausch die freie, unkomplexierte Form des Bis(cyclopeptids) erfordert. Sinkt die Konzentration dieses freien Bis(cyclopeptids) z.B. indem man das Komplexierungsgleichgewicht durch Zugabe von Natriumsulfat weiter auf die Seite des Komplexes verschiebt, nimmt die Geschwindigkeit des H/D-Austausches ab. Quantitativ stehen die erhaltenen Ergebnisse aber nicht mit denen von E. Eugenieva-Ilieva im Einklang, was wahrscheinlich auf die höhere Reinheit des hier isolierten Produkts zurückzuführen werden kann. Weiterhin wurde die Beobachtung von E. Eugenieva-Ilieva bestätigt, dass die einzelnen Deuterierungsstufen von **48** NMR spektroskopisch unterschieden werden können, da das NH-Signal während des H/D-Austausches aufspaltet.

#### 3.6 Ausblick

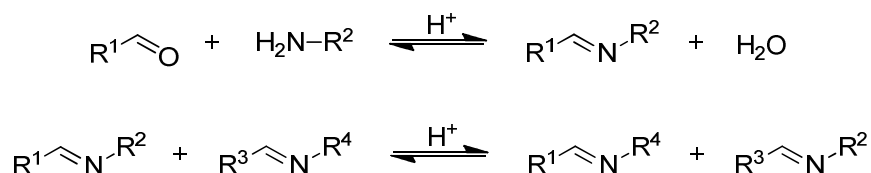
Während meiner Arbeiten zur Synthese des dreifach verbrückten Bis(cyclopeptids) **48** trat bei der Isolierung des gewünschten Produktes eine Oxidation auf, vermutlich an den Disulfidbrücken zwischen den beiden Cyclopeptiduntereinheiten. Diese Nebenreaktion wurde zum ersten Mal in unserer Arbeitsgruppe beobachtet, obwohl sich bereits andere Mitglieder mit ähnlichen Systemen beschäftigten. Weitergehende Untersuchungen sollten zum Ziel haben, diese Oxidation zu verhindern, um letztlich sauberes Produkt zugänglich zu machen.

Nach der Isolierung von reinem Bis(cyclopeptid) **48** können dann weitergehende Untersuchungen zur Anionenaffinität erfolgen. Aufbauend auf v.a. von E. Eugenieva-Ilieva erhaltenen Ergebnissen muss die Anionenaffinität von **48** noch quantifiziert werden. Interessant wäre es außerdem, die Anionenaffinität von **48** mit der des Sulfat-bindenden Proteins zu vergleichen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob mit **48** ein synthetischer Rezeptor identifiziert werden konnte, dessen Bindungseigenschaften mit denen eines natürlichen Systems konkurrieren können. Für diese Untersuchungen ist möglicherweise ein besser wasserlösliches Derivat von **48** erforderlich. An der Synthese einer solchen Verbindung sollte in Zukunft ebenfalls gearbeitet werden.

## 4 Aufbau komplexer Strukturen über Imin-verbrückte Cyclopeptide

### 4.1 Einleitung

Molekulare Kapseln sind Wirtmoleküle mit einem definierten Hohlraum, deren Größe im Nanometermaßstab liegt. Sie sind aus rigiden käfigartigen Molekülen oder Aggregaten von Molekülen aufgebaut und können im Innern verschiedenartige Gäste einlagern. Ein Beispiel für einen käfigartigen Rezeptor ist das in Kapitel 3 vorgestellte Bis(cyclopeptid) **48**. Die Synthese dieser Systeme ist eine große Herausforderung, wobei eine vielversprechende Strategie oftmals auf der dynamischen kombinatorischen Chemie beruht.<sup>[67]</sup> Besonders nützlich ist die Verwendung des Imin austauschs als reversibler Reaktion, die auf der Kondensation von Carbonylverbindungen mit (primären) Aminen beruht (Schema 24).



Schema 24 Bildung von Iminen sowie reversibler Imin austausch.

Durch die Reversibilität dieser Reaktion, die eine Voraussetzung für ihren Einsatz in der DCC ist, ist eine Fehlerkorrektur beim Aufbau molekularer Kapseln möglich. Dadurch können hohe Ausbeuten bis hin zum quantitativen Umsatz realisiert werden. Durch die Dynamik der Reaktion ergeben sich vielfältige Möglichkeiten für die Komplexierung oder Freisetzung von Gästen und auch die gezielte Einflussnahme auf die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts ist beim Imin austausch möglich.<sup>[68]</sup> Ein Nachteil der Reaktion ist allerdings die Instabilität der Produkte. Eine Isolierung stabiler Endprodukte erfordert darum die Reduktion der Imine zu Aminen. Von Interesse sind solche Kapseln als Nanoreaktoren,<sup>[69]</sup> in denen auch instabile Intermediate eingeschlossen werden können<sup>[70]</sup> oder mit denen die Beschleunigung einer Reaktion erreicht werden kann.<sup>[71]</sup> Des Weiteren kann durch die Durchführung der Reaktion im Innern solcher Nanoreaktoren eine Veränderung der Stereo-<sup>[72]</sup> sowie Regioselektivität erreicht werden.<sup>[73]</sup>

Vor allem die Arbeitsgruppe von Warmuth verwendete die Imin-Chemie zum Aufbau molekularer Kapseln. Hierzu wurden geeignete Bausteine zu symmetrischen, dreidimensionalen Gebilden kondensiert. Ein beliebter Baustein basiert auf einem

Tetraformylcavitand (vgl. Abb. 67), der mit Diaminen oder Triaminen umgesetzt wurde. Dabei wurden neben [2+4]-Hemicarceranden je nach Struktur und Verhältnis der Komponenten auch die Bildung tetraedrischer oder oktaedrischer Produkte beobachtet.<sup>[74]</sup>

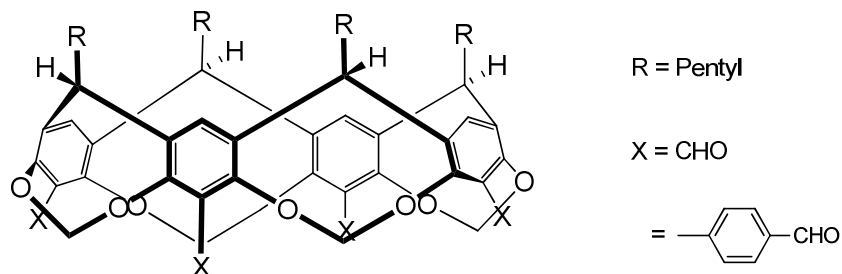


Abb. 67: Cavitand mit Formylgruppen für die Synthese verschiedener Kapseln.

Die Struktur der Produkte wird dabei wesentlich durch die Struktur der verwendeten Bausteine kontrolliert. Templateffekte durch geeignete Substrate, die der Reaktionsmischung zugesetzt wurden, spielen eine zusätzliche, jedoch meist untergeordnete Rolle.<sup>[75]</sup>

Auch in den Arbeiten von Nitschke spielen Imine für den Aufbau Kapsel-förmiger Strukturen eine tragende Rolle. Als reversible Reaktion wurde hierbei der Imin austausch zwischen einem Formylpyridin und einem Amin in Gegenwart eines Übergangsmetalls verwendet. Die Koordination des Imins an das Metall stabilisiert die Struktur und durch den gebildeten Komplex ergeben sich zusätzlich geometrische Parameter der Produkte. Das Besondere dieser Komplexbildung ist, dass die Reaktionen auch in Gegenwart von oder in reinem Wasser ablaufen können.<sup>[76]</sup> Ein Beispiel für eine tetraedrische Kapsel, die auf Basis dieser Strategie aufgebaut wurde, ist in Abb. 68 dargestellt.<sup>[77]</sup>

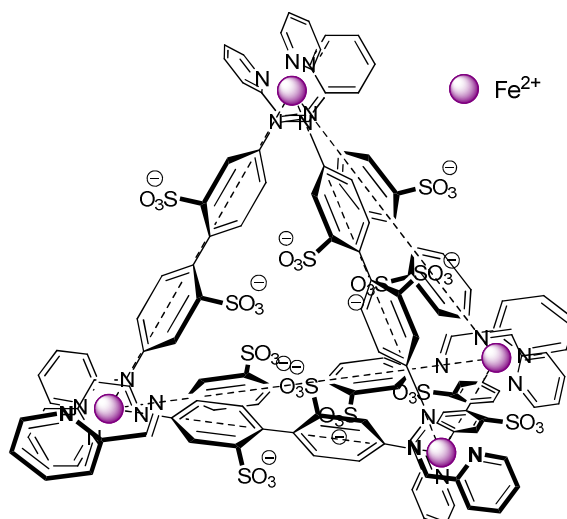


Abb. 68: Tetraedrische Kapsel aus Fe(II)-Komplexen verbrückt über Imine.

Als Bausteine dienten 2-Formylpyridin, Benzidin-2,2-disulfonsäure und Eisen(II)sulfat. In den Hohlraum dieser Kapsel können kleine unpolare Moleküle wie Cyclohexan, -pentan oder Schwefelhexafluorid aber auch der pyrophore weiße Phosphor eingelagert werden, der nach Einlagerung in die Kapsel nicht nur in die wässrige Phase überführt werden kann, sondern durch den Einschluss auch stabilisiert wird.<sup>[78]</sup> Während sich bei dieser Kapsel die Liganden auf den Kanten befinden können mit Hilfe von  $C_3$ -symmetrischen Triaminen auch tetraedrische Kapseln generiert werden, bei denen die Liganden die Flächen darstellen.<sup>[79]</sup> In einem anderen Ansatz wurden die funktionellen Gruppen innerhalb der Metallkomplexe der tetraedrischen Kapseln vertauscht: für die Achsen wird 6,6'-Di-formyl-3,3'-bipyridin verwendet, welches in Gegenwart von Eisen(II)salzen mit aromatischen Aminen zur Reaktion gebracht wird. Diese Kapsel bindet Anionen, wie Tetrafluoroborat, Triflat oder Hexafluorophosphat, wobei Hexafluorophosphat am besten gebunden wird ( $K_a = 1.3 \cdot 10^6$ ).<sup>[80]</sup> Auch pentagonal prismatische oder würfelförmige Strukturen konnten mit Hilfe dieser Strategie realisiert werden.<sup>[81]</sup>



## 4.2 Aufgabenstellung

Ausgehend von Cyclopeptid **2** mit den Amino-funktionalisierten Seitenketten, wäre eine weitergehende strukturelle Veränderung unter Ausnutzung des Imin austausches möglich. Reaktionspartner von **2** wären entsprechend geeignete Aldehyde. Bei Verwendung von Dialdehyden wäre es gegebenenfalls möglich, zwei Untereinheiten von **2** zu verknüpfen (Abb. 69). Bei Verwendung von Trialdehyden, z.B. 1,3,5-Triformylbenzol, könnten die drei peripheren Seitenketten von **2** an eine gemeinsame Plattform gebunden werden, wodurch ein strukturell definierter Hohlraum entstehen würde und die Vororganisation des Rezeptors verbessert werden könnte.

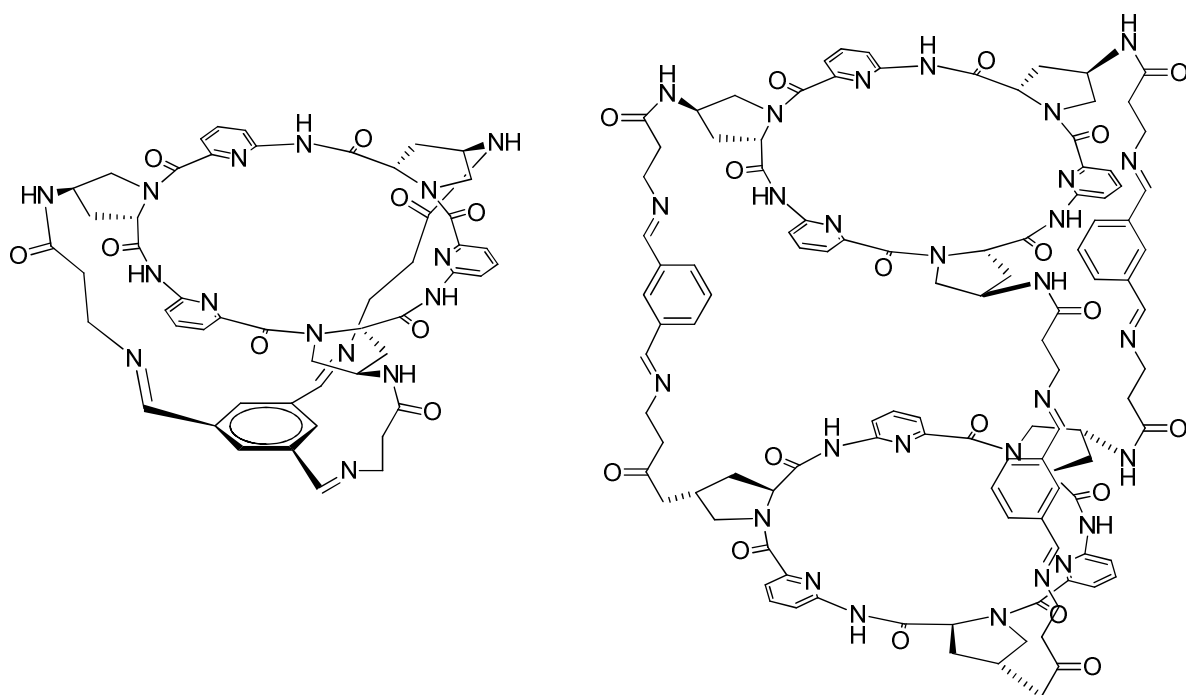


Abb. 69: Beispiele für Imin-verknüpfte Rezeptoren, die ausgehend von Cyclopeptid **2** durch Reaktion mit Trialdehyden oder Dialdehyden erhalten werden können.

### 4.3 Synthese und Untersuchungen

#### 4.3.1 Iminbildung

Um Informationen zu erhalten, ob das Cyclopeptid **2** als Aminkomponente für den Aufbau komplexer Molekülarchitekturen mittels Imin austausch eingesetzt werden kann, wurde das deprotonierte Triamin **2** (Abb. 70), welches durch Hydrierung von **20** ohne Zusatz von Salzsäure erhalten wurde, mit verschiedenen Aldehyden umgesetzt. Die Reaktion erfolgte im NMR Maßstab und unter Bedingungen, unter denen die Reaktion von Benzylamin mit Benzaldehyd nachweislich anhand des im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum auftretenden Iminpeaks zu einem Imin führt.<sup>[68]</sup> Die Umsetzung erfolgte in getrocknetem deuterierten Methanol.

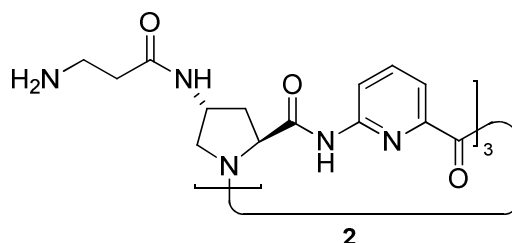


Abb. 70: Cyclopeptidtriamin **2** für die Umsetzung mit Aldehyden.

Als Aldehyde wurden Benzaldehyd und die in Abb. 71 gezeigten Dialdehyde eingesetzt, mit denen kapselförmige Produkte mit mindestens zwei Cyclopeptiduntereinheiten zugänglich sein sollten. Neben den Phthalaldehyden wurde noch 4-Methoxy-2,6-pyridindialdehyd genutzt, da dieses im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum einen einfachen Signalsatz mit lediglich drei Singulets aufweist.

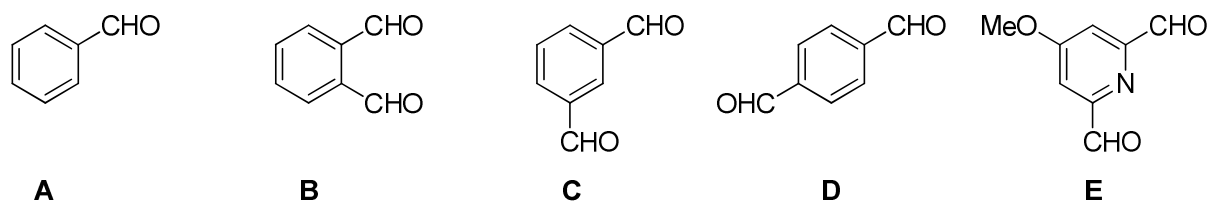
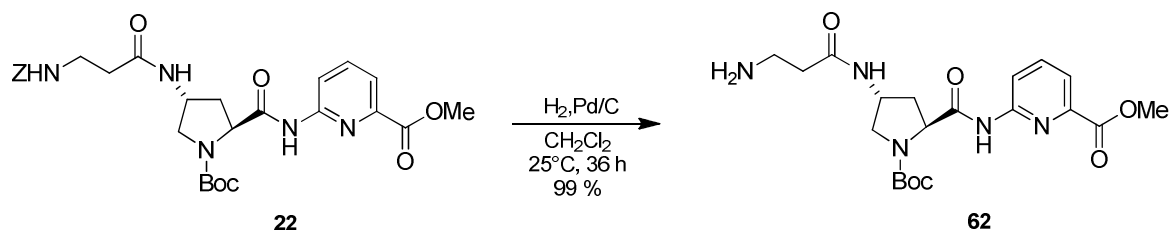


Abb. 71: (Di)Aldehyde für die Umsetzung mit **2**.

In keiner der Reaktionslösungen konnte eine Iminbildung beobachtet werden. Auch ein Zusatz von Molsieb führte nicht zu dem Auftreten charakteristischer Iminsignale und zu einem Verschwinden der Aldehydsignale in den  $^1\text{H}$ -NMR Spektren.<sup>[82]</sup> Die Zugabe von 2 equiv Natriumsulfat, dessen Sulfatanionen als Template für kapselförmige Produkte dienen können, brachte ebenfalls keine Verbesserung. Weitere Studien zur Iminbildung wurden mit

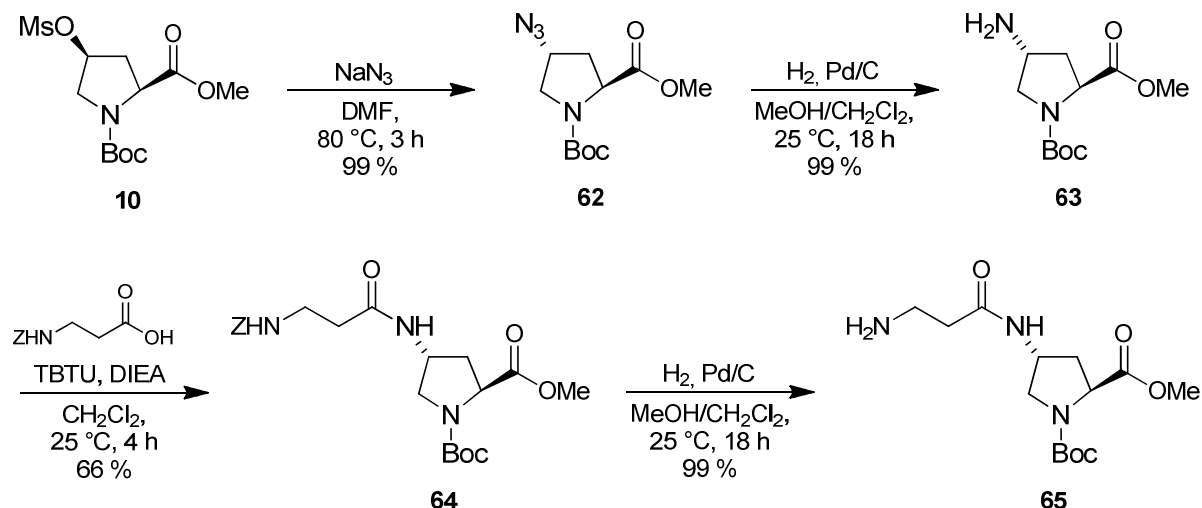
dem Dipeptid **62** durchgeführt, das gemäß Schema 25 aus **22** durch Hydrierung erhalten wurde. Hierfür wurde **62** mit Benzaldehyd umgesetzt.



Schema 25 Synthese des Dipeptids **62**.

Als Lösungsmittel wurden  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  und  $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1 (v/v) getestet. In keinem wurde ein Umsatz beobachtet. Um zu überprüfen, ob eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit die Ursache sein könnte, wurde TFA als Katalysator zugesetzt.<sup>[83]</sup> Auch dieser Zusatz führte nicht zur Bildung des gewünschten Imins.

Nun wurde das Substrat strukturell weiter vereinfacht und anstelle von **62** das Prolinderivat **65** eingesetzt. Dieses wurde ausgehend von dem bekannten Mesyloxy-funktionalisierten Baustein **10** aufgebaut, welcher zunächst in das Azid **62** überführt und anschließend zu **63** reduziert wurde. Durch Kupplung mit TBTU wurde die  $\beta$ -Alanin Seitenkette angebracht und im letzten Schritt die Z-Schutzgruppe abgespalten (Schema 26).



Schema 26 Synthese des Prolin-Bausteins **65**.

Mit diesem Amin **65** wurden nun ebenfalls Reaktionen mit Benzaldehyd in verschiedenen Lösungsmitteln angesetzt. Doch auch hier waren in den  $^1\text{H}$ -NMR Spektren keine typischen

Imin-Signale sichtbar. Stattdessen wurden selbst nach längerer Zeit und Zugabe von 10 mol% TFA immer noch die Signale für die Aldehyd-Protonen beobachtet.

Um sicher zu gehen, dass eine Umsetzung zu Iminen mit den  $\beta$ -Alaninderivaten überhaupt möglich ist, wurde im Folgenden versucht,  $\beta$ -Alanin und  $\beta$ -Alaninmethylester mit Benzaldehyd umzusetzen. In  $\text{CD}_3\text{OD}$  bzw.  $\text{DMSO}-d_6$  konnte NMR spektroskopisch in beiden Reaktionen eindeutig die Iminbildung anhand des Signals bei 8.37 ppm nachgewiesen werden (Abb. 72).

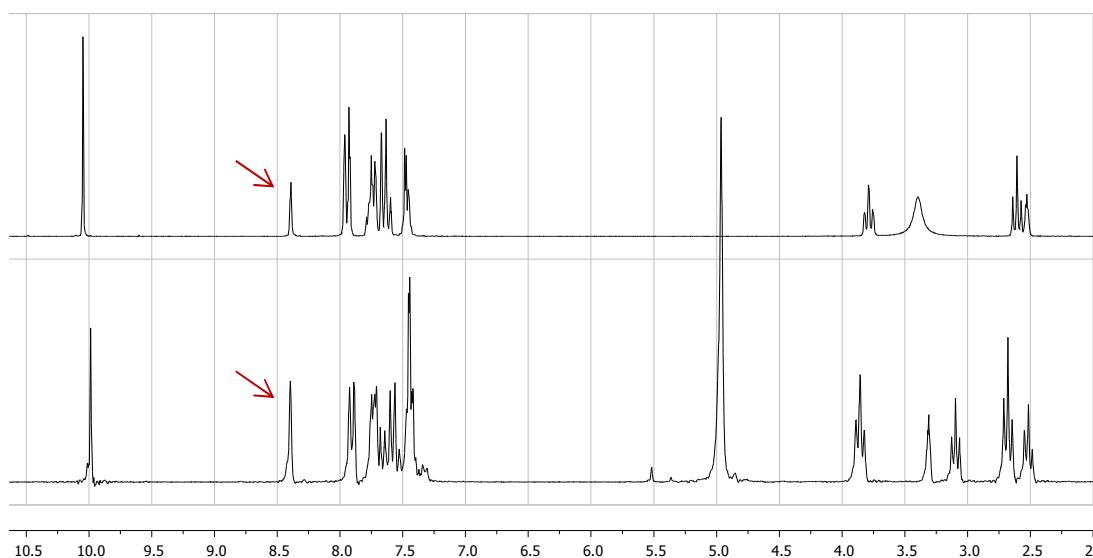


Abb. 72:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum der Reaktionen zwischen Benzaldehyd und  $\beta$ -Alaninderivaten.

Dieser Versuch zeigte, dass  $\beta$ -Alaninderivate prinzipiell mit Aldehyden zu Iminen reagieren. Die Gegenwart des Prolinrestes in **65** verhindert aber bereits die Iminbildung aus bisher nicht bekannten Gründen. Damit ist ein Aufbau komplexer Strukturen ausgehend von **2** mit dieser Strategie nicht möglich.

Im Folgenden wurde nun versucht, auf Basis der Strategie von Nitschke Cyclopeptid **2** mit 2-Formylpyridin in Gegenwart von Eisen(II)salzen umzusetzen. Die mögliche Zielstruktur dieser Umsetzung ist in Abb. 73 gezeigt. Als Lösungsmittel dienten neben  $\text{DMSO}-d_6$  auch  $\text{ACN}-d_3$ , wobei das Cyclopeptid in letzterem nicht gut löslich ist. Bei beiden Reaktionen wurde die charakteristische Farbveränderung der Lösung beobachtet, die ein Indikator für die Bildung eines oktaedrischen low-spin Eisen(II)*tris*(pyridylimin) Komplex ist.<sup>[84]</sup> Außerdem ging **2** bei der Reaktion in  $\text{ACN}-d_3$  langsam in Lösung. Allerdings war die Färbung in den Reaktionslösungen nur sehr schwach.

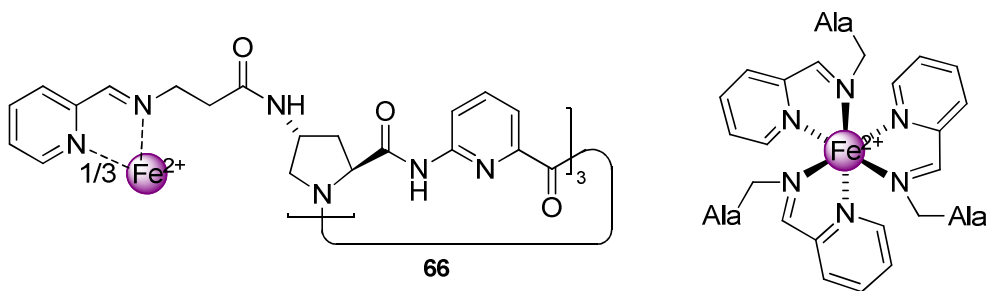
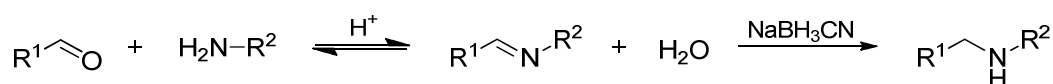


Abb. 73: Oktaedrischer Eisenkomplex aus **2** und 2-Formylpyridin.

Zur Überprüfung der Reaktion wurde als Referenzexperiment Tris(2-aminoethyl)amin und 2-Formylpyridin in Anwesenheit von Eisen(II)salzen im NMR-Maßstab umgesetzt. Bei Zugabe des Salzes färbte sich die Reaktionslösung sofort intensiv violett, was auf eine direkte Bildung des Komplexes schließen lässt. Im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum war nach der Umsetzung kein Aldehyd-Signal mehr sichtbar was auf einen vollständigen Umsatz schließen lässt. In der Reaktion mit Cyclopeptid **2** konnte <sup>1</sup>H-NMR spektroskopisch jedoch keinerlei Umsatz festgestellt werden, was zeigt, dass eine Iminbildung bei diesem Cyclopeptid auch in Gegenwart stabilisierender Übergangsmetallionen nicht gelingt. Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren sind im Anhang abgebildet.

#### 4.3.2 Reduktive Aminierung

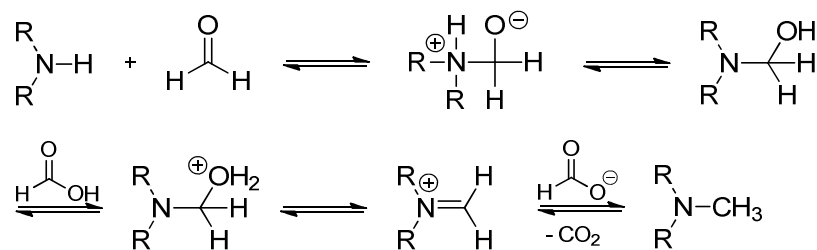
Über ähnliche Probleme der Iminbildung bei analogen Cyclopeptidaminen, in diesem Fall einem Cyclopeptid aus (4*S*)-4-Aminoprolin- und 6-Aminopicolinsäureeinheiten, berichtet auch M. Zengerle in seiner Diplomarbeit.<sup>[39]</sup> Er konnte zeigen, dass bei Zusatz von Natriumcyanoborhydrid zu der Reaktionsmischung aus dem Cyclopeptid und verschiedenen Dialdehyden Bis(cyclopeptide) isoliert werden können. Unter diesen Bedingungen wird das entstandene Imin in situ zum Amin reduziert (Schema 27).<sup>[85]</sup>



Schema 27 Reaktionsgleichung der reduktiven Aminierung.

Unter analogen Bedingungen wurde deshalb **2** mit 3 equiv Benzaldehyd in Anwesenheit von Natriumcyanoborhydrid in verschiedenen Lösungsmitteln umgesetzt. Als Lösungsmittel diente neben trockenem DMSO auch Methanol. Die Reaktionsmischungen wurden mit Hilfe

der analytischen HPLC untersucht und die verschiedenen Produktpeaks mittels MALDI Massenspektrometrie untersucht. Nachdem nach einem Tag neben dem dreifach substituierten Produkt noch einfach und zweifach funktionalisiertes Cyclopeptid zu sehen war, wurde Benzaldehyd nachdosiert. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen kein einheitliches Produkt gebildet wurde und stattdessen eine Vielzahl an verschiedenen Produkten in den Reaktionslösungen beobachtet wurden, die teilweise das gleiche  $m/z$ -Verhältnis aufwiesen. Außerdem bildeten sich bei Überschuss des Aldehyds nicht nur sekundäre, sondern auch tertiäre Amine, so dass die Produktvielfalt zusätzlich erhöht wurde. Die Bildung der tertiären Amine kann durch Auftreten intermediäre Iminiumionen erklärt werden.<sup>[86]</sup> Der Bildungsmechanismus ähnelt der Eschweiler-Clarke-Reaktion, bei der primäre oder sekundäre Amine mit Formaldehyd in Anwesenheit von Ameisensäure methyliert werden (Schema 28).<sup>[87]</sup>



Schema 28 Mechanismus der Eschweiler-Clarke-Reaktion.

Laut Literatur sollte bei Durchführung der Reaktion in Trimethylorthoformiat (TMOF) ausschließlich das monoalkylierte Produkt gebildet werden, so dass ich dieses als Lösungsmittel in meine Untersuchungen einbezog.<sup>[88]</sup> Bei der Analyse dieser Reaktion zeigte sich, dass das Produktspektrum bei Verwendung von TMOF als Lösungsmittel nicht so breit gefächert war, wie beim Einsatz von Methanol oder DMSO. Jedoch wurden auch hier tertiäre Amine gebildet, so dass eine aufwendige Trennung des Produktgemisches notwendig wäre (Abb. 74).

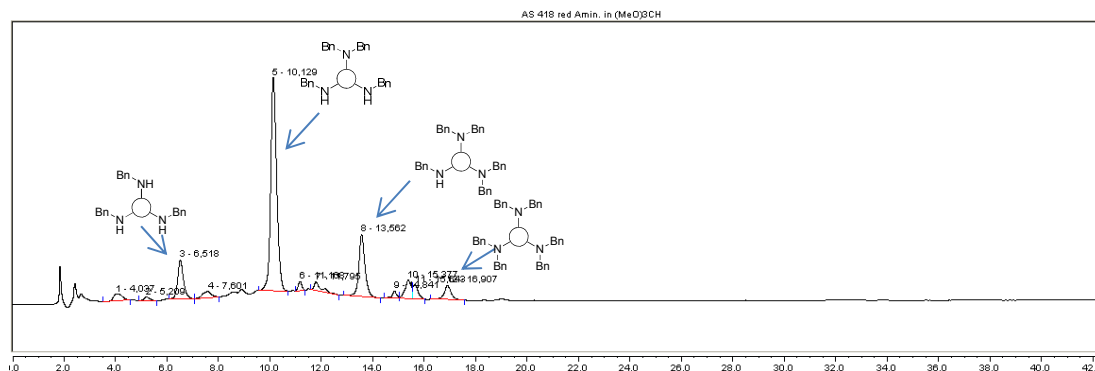


Abb. 74: HPLC Chromatogramm der reduktiven Aminierung in TMOF.

Eine weitere Komplikation ergibt sich daraus, dass einige der möglichen Produkte als Konstitutionsisomere bzw. Diastereomere vorliegen (Abb. 75), so dass mit diesem Verfahren schwerlich zu einem einheitlichen Produkt zu kommen ist.

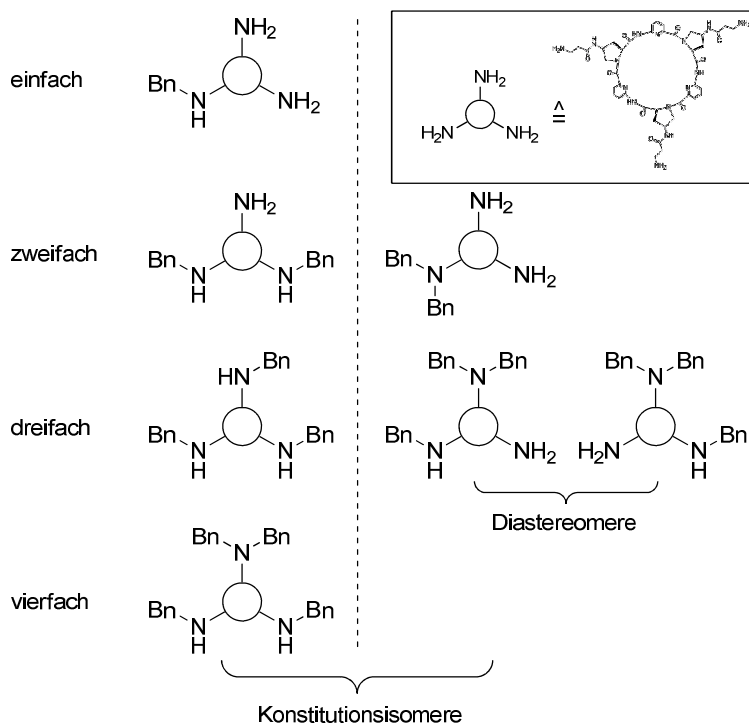


Abb. 75: Übersicht über die gebildeten Produkte.

### 4.4 Zusammenfassung

Die Umsetzung des Cyclopeptids **2** mit Aminen zu den entsprechenden Iminen konnte nicht realisiert werden, so dass der Aufbau molekularer Kapseln auf Basis dieses Grundbausteins nicht möglich war. Durch Variation der für diese Reaktionen verwendeten Edukte konnte ich herausfinden, dass eine Umsetzung weder auf Stufe des Cyclopeptidtriamins, noch mit dem analogen Dipeptid oder Prolinbaustein, sondern lediglich mit Derivaten des  $\beta$ -Alanins verwirklicht werden konnte. Eine modifizierte Synthese durch reduktive Aminierung war aufgrund der Vielfalt der entstandenen Nebenprodukte und der dadurch erschwerten Aufreinigung sowie der schlechten Ausbeute keine Alternative.

Eine andere Strategie verfolgte auf Basis einer von Nitschke etablierten Strategie die Umsetzung des Cyclopeptids **2** mit 2-Formylpyridin in Gegenwart von Eisen(II)salzen, wodurch sich ein oktaedrischer Komplex ergeben sollte. Allerdings wurde keine Komplexbildung und damit Iminbindung nachgewiesen.

### 4.5 Ausblick

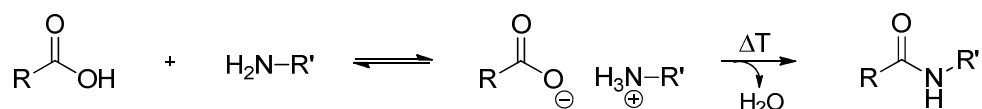
Warum eine Iminbildung mit den hier eingesetzten Peptiden nicht beobachtet werden konnte, sollte in nachfolgenden Arbeiten systematisch untersucht werden. Eine weitere Alternative läge in der Inversion der für die Iminbildung notwendigen funktionellen Gruppen. So könnten Cyclopeptide mit Aldehydgruppen verwendet werden, die mit verschiedenen Aminen umgesetzt werden könnten. Die Synthese eines entsprechenden 4-Formylprolins ist literaturbekannt und kann mit Hilfe der Mitsunobu-Reaktion realisiert werden.<sup>[89]</sup> Damit wäre ein entsprechendes Triformylcyclopeptid prinzipiell zugänglich.



## 5 Optimierung der Peptidbindungsknüpfung

### 5.1 Einleitung

Die zugrundeliegende und damit wichtigste Reaktion für den Aufbau der Cyclopeptide ist die Peptidkupplung. Eine Peptidgruppe entsteht formal durch Kondensation der Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxyfunktion einer anderen Aminosäure. Ohne vorherige Aktivierung ist eine direkte Umsetzung der beiden Komponenten trotz der hohen thermodynamischen Stabilität der entstehenden Amidbindung schwierig. Typischerweise reagieren Amine und Carbonsäuren unter Säure-Base-Reaktion zu einem Salz (Schema 29). Nur bei hohen Temperaturen, die allerdings nur wenige funktionelle Gruppen tolerieren, kommt es zur Kondensation.<sup>[90]</sup> Zudem sind für diese Reaktionen oft lange Reaktionszeiten erforderlich.<sup>[91]</sup> Etwas günstiger verlaufen die Umsetzungen unter Mikrowellen-Bedingungen.<sup>[92]</sup> Weitere Fortschritte bezüglich der thermischen Amidierung von Carbonsäuren wurden kürzlich durch den Einsatz von Molekularsieb erreicht.<sup>[93]</sup>



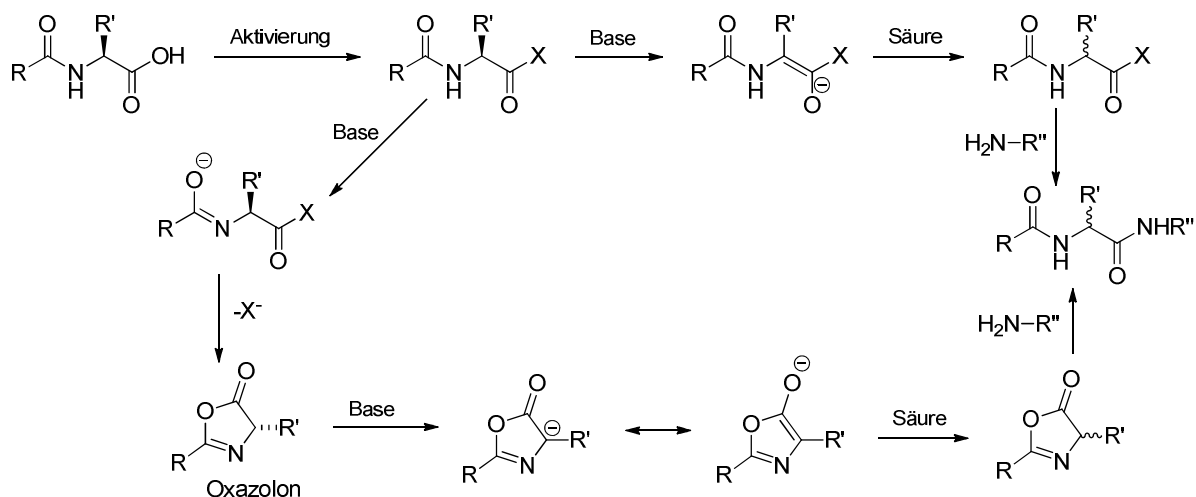
Schema 29 Reaktionen von Carbonsäuren und Aminen.

Bei Aktivierung der Carbonsäure kann eine Reaktion unter sehr viel milderen Bedingungen erreicht werden. Diese Aktivierung erfolgt durch Einführung einer Abgangsgruppe an der Acylfunktion bei gleichzeitiger Verringerung der Elektronendichte am Carbonyl-C-Atom. Die Hydroxygruppe der freien Carbonsäure kann in ein Säurehalogenid, ein Azid, ein Anhydrid oder einen Ester überführt werden. Darüber hinaus kommen sogenannte Kupplungsreagenzien, wie z.B. Carbodiimide, Phosphonium- oder Uroniumsalze, zum Einsatz, die Carbonsäuren in aktivierte Derivate überführen. Solche Reagenzien haben aber häufig Nachteile. Neben ihrem hohen Preis ist die Kupplungsreaktion mit einer erhöhten Menge an Abfall und ungünstiger Atomökonomie verbunden, da das Reagenz in stöchiometrischen Mengen zugegeben werden muss.

Alternative Reagenzien, die als Aktivatoren in der Peptidkupplung eingesetzt werden, sind z.B. Arylboronsäuren,<sup>[94]</sup> Titan(IV)chlorid,<sup>[95]</sup> Trimethylaluminium,<sup>[96]</sup> Lawessons Reagenz<sup>[97]</sup> oder das Mukaiyama-Reagenz,<sup>[98]</sup> welche ebenfalls in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden müssen. Neben dem hohen Preis und der teilweise geringen Verfügbarkeit besitzen

diese Systeme noch weitere gravierende Nachteile, wie ihre Toxizität, ihre Instabilität oder eine erschwerte Aufreinigung da sich gebildete Nebenprodukte nur schwer entfernen lassen.

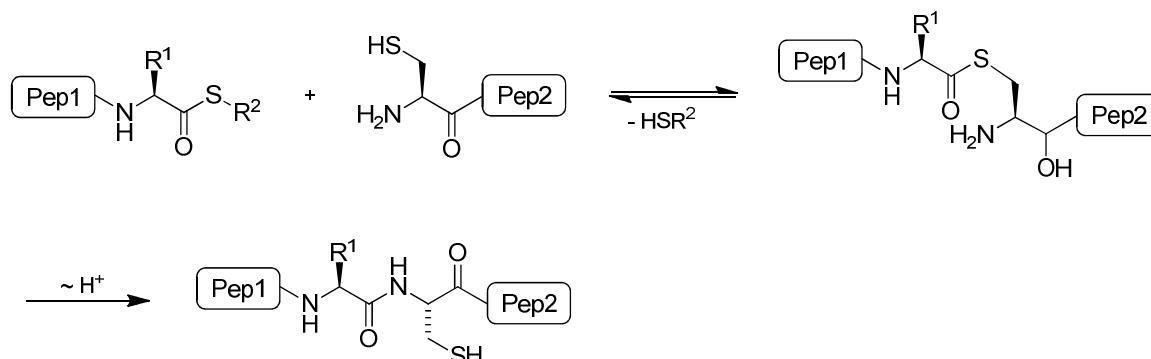
Ein weiteres Problem bei der Peptidkupplung, das insbesondere nach Aktivierung der Carbonsäure bzw. bei Behandlung mit Base auftreten kann, ist die Racemisierung. Die Einführung einer guten Abgangsgruppe hat eine gesteigerte Acidität des H( $\alpha$ )-Protons zur Folge oder begünstigt die Bildung eines Oxazolons (Schema 30). Als Zwischenprodukt wird in beiden Fällen eine planare Zwischenstufe erhalten, deren Weiterreaktion zu einem Racemat führt. Steuerbar ist diese Nebenreaktion über verschiedene Faktoren, wie die Temperatur, die eingesetzte Base, die Beschaffenheit der Abgangsgruppe oder auch der Substituenten an dem Peptidfragment.



Schema 30 Mechanismus der Racemisierung.

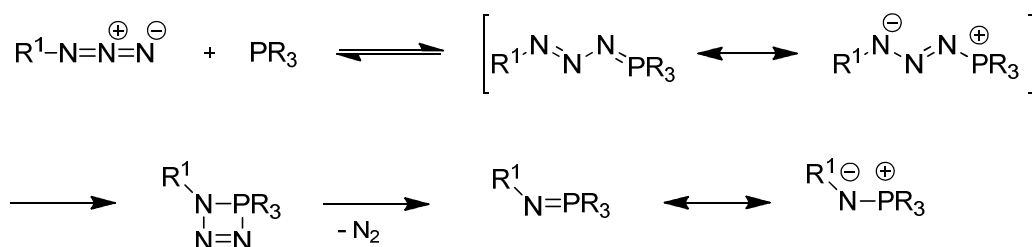
Ein besonders leistungsfähiges Verfahren zur Knüpfung von Peptidbindungen ist die native chemische Ligation,<sup>[99]</sup> deren zugrundeliegende Reaktion bereits seit Mitte der 50er Jahre bekannt ist.<sup>[100]</sup> Diese Reaktion ist chemoselektiv und in wässrigem Milieu durchführbar. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass bei dieser Methode keine Schutzgruppen benötigt werden. Eine Einschränkung bestand lange darin, dass die Kupplung bei der Aminokomponente auf Cystein beschränkt war.<sup>[101]</sup> Diese Einschränkung wurde aber dahingehend behoben, dass man Methoden entwickelte, mit denen die Thiol-Seitenkette an der Kupplungsposition in eine Methylgruppe und somit Cystein in Alanin überführt werden kann. Beispiele sind Entschwefelungsreaktionen unter Einsatz von Raney-Nickel<sup>[102]</sup> oder Palladium<sup>[103]</sup> oder durch radikalische Reaktion in Gegenwart von Triethylphosphit in wässrigem Medium.<sup>[104]</sup> Thiolgruppen anderer Cysteine im Peptidrückgrat müssen zuvor geschützt werden, so dass

selektiv nur an einer Aminosäure entschweifelt wird. Ein weiterer Aspekt dieser Reaktion besteht darin, dass die Carbonsäurekomponente als Thioester vorliegen muss, was einen zusätzlichen Reaktionsschritt erfordert (Schema 31).



Schema 31 Reaktionsmechanismus der nativen chemischen Ligation.

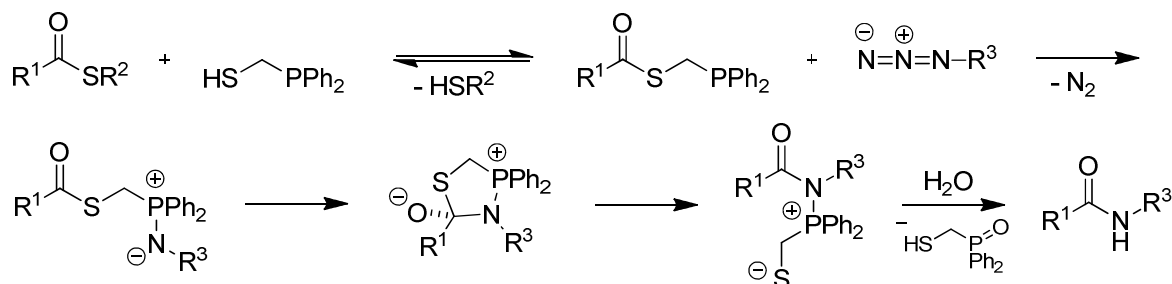
Eine Variation dieser Strategie besteht in der Staudinger-Ligation, die auf der 1919 von Staudinger und Meyer erstmals vorgestellten Reaktion zwischen Aziden und Phosphanen beruht.<sup>[105]</sup> Als Primärprodukt wird dabei durch nucleophilen Angriff des Phosphoratoms des Phosphans an das Azid ein Phosphazid gebildet, welches über einen intramolekularen Ringschluss und anschließender Stickstoffabspaltung zu einem Iminophosphoran umlagert (siehe Schema 32).



Schema 32 Staudinger-Reaktion.

Diese Reaktion lässt sich mit der nativen chemischen Ligation kombinieren. Die sogenannte spurlose Staudinger-Ligation wurde parallel in den Arbeitsgruppen von Bertozzi<sup>[106]</sup> und Raines<sup>[107]</sup> entwickelt und 2000 fast gleichzeitig publiziert. So besteht in der Umsetzung eines Carbonsäurethioesters mit z.B. Diphenylphosphanylmethanthiol.<sup>[108]</sup> Im ersten Schritt erfolgt eine Umesterung des Thioesters. Das erhaltene Produkt reagiert analog zu der Staudinger-Reaktion mit einem Azid zum Aza-Ylid, dessen Stickstoffatom nucleophil an die Carbonylgruppe angreifen kann. Nach Weiterreaktion unter Spaltung der C–S Bindung erfolgt

schließlich die Hydrolyse zum gewünschten Amid und Phosphinoxid als Nebenprodukt (Schema 33).



Schema 33 Spurlose Staudinger-Ligation zur Generierung von Amidinen.

Bei den beiden abgebildeten Ligationismethoden treten Thiole im Überschuss als Reaktionspartner bzw. Abfallprodukte auf, welche während der Reaktion leicht zu Disulfiden oxidiert werden können. Der Einsatz von redox-sensitiven Substraten ist unter diesen Bedingungen allerdings ausgeschlossen.

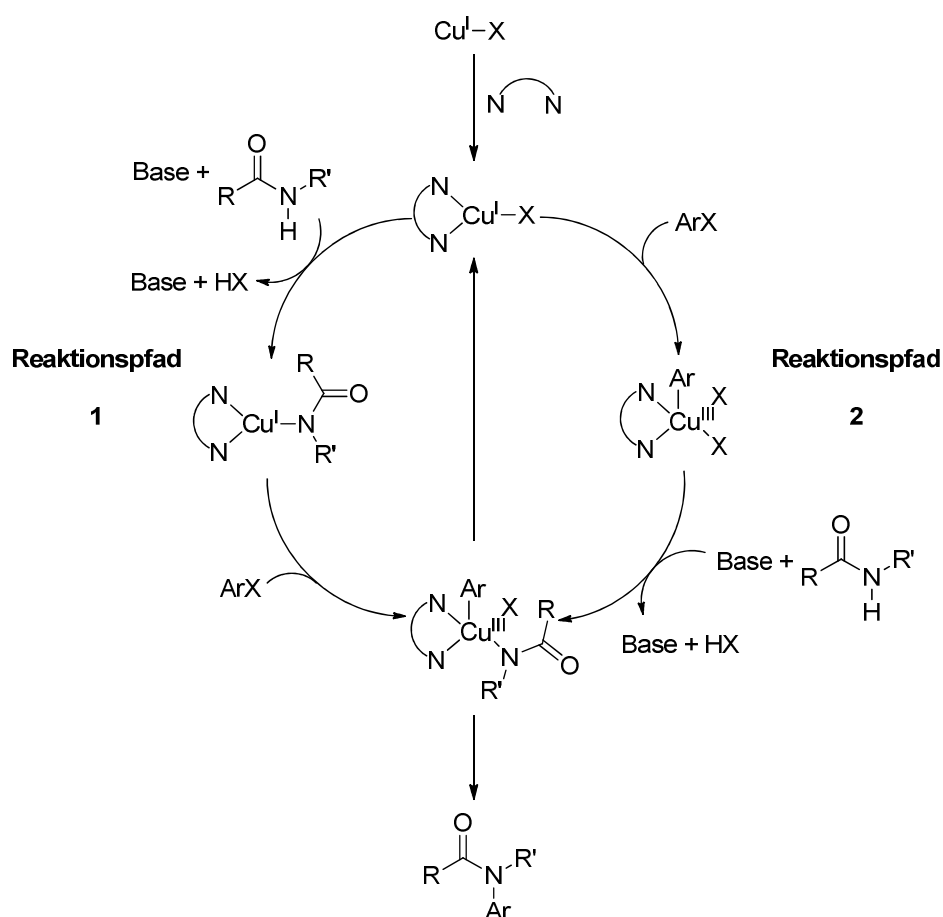
Eine relativ neue Kupplungsreaktion, die ebenfalls ohne den Einsatz von Additiven oder Schutzgruppen auskommt und kürzlich in der Arbeitsgruppe Bode vorgestellt wurde, ist die decarboxylierende Kondensation von *N*-Alkylhydroxylaminen mit  $\alpha$ -Ketosäuren in DMF.<sup>[109]</sup> Als Nebenprodukte fallen bei dieser Reaktion lediglich Wasser und Kohlendioxid an, was diese Kupplungsmethode in Bezug auf die Aufreinigung sehr attraktiv macht. Setzt man Isoxazolidine statt *N*-Alkylhydroxylaminen ein, so lässt sich ein Peptid sequentiell aufbauen.<sup>[110]</sup> In diesem Fall muss die Säure allerdings als Ester eingesetzt werden, um unerwünschte Kupplungen zu vermeiden. Die Säure wird vor dem Kupplungsschritt in situ durch Verseifung freigesetzt. Ein weiterer Vorteil dieser Reaktion ist neben ihrer Chemoselektivität die Durchführbarkeit in wässrigen Lösungsmitteln.

Gerade in den letzten Jahren wurden viele katalytische Methoden vorgestellt, mit denen Amidbindungsknüpfungen möglich sind. Bei diesen Reaktionen wird die Kondensation durch Übergangsmetallkomplexe katalysiert. Dadurch sind diese Synthesen sehr atom-ökonomisch und umweltfreundlich. Abgesehen davon zeichnen sie sich durch ihre milden Reaktionsbedingungen sowie eine ausgezeichnete Selektivität aus und sind je nach Art des Katalysators auch kostengünstig. Mit Hilfe von verschiedensten Metallkomplexen lassen sich auf diese Weise Amide aus Carbonsäuren,<sup>[111]</sup> Estern,<sup>[112]</sup> Alkoholen<sup>[113]</sup> bzw. Aldehyden,<sup>[114]</sup> Nitrilen<sup>[115]</sup> sowie Oximen<sup>[116]</sup> oder durch Aminocarbonylierung<sup>[117]</sup> von Aryl- bzw.

Vinylhalogeniden herstellen. Für die Synthese bestimmter Amide eignen sich darüber hinaus *N*-Arylierungen oder *N*-Alkenylierungen von Amiden. Eine aus der Buchwald-Hartwig-Kupplung abgeleitete Variante stellt die von Buchwald 2000 erstmals beschriebene Palladium-katalysiert Kupplung primärer und sekundärer Amide mit Aryliodiden, -bromiden oder auch -triflaten dar.<sup>[118]</sup> Als Liganden fungierten hierbei in erster Linie Phosphine, wobei sich v.a. Xantphos als sehr potent erwiesen hat.<sup>[119]</sup> Mit Hilfe dieses Protokolls ist auch die Kupplung mit Arylchloriden,<sup>[120]</sup> Mesylaten<sup>[121]</sup> oder Arylsulfonaten<sup>[122]</sup> an Amide möglich. Allerdings ist diese Methode keine Kupplung sondern eine Funktionalisierung von Amiden und ihre Anwendung auf den Einsatz von Aromaten als „Kupplungspartnern“ begrenzt, so dass kein Zugang zu Peptiden mit Hilfe dieser Strategie möglich ist. Vorteil dieser Methode ist allerdings, dass die Amide bereits vorgebildet sind und lediglich funktionalisiert werden, wodurch eine Racemisierung praktisch ausgeschlossen werden kann.

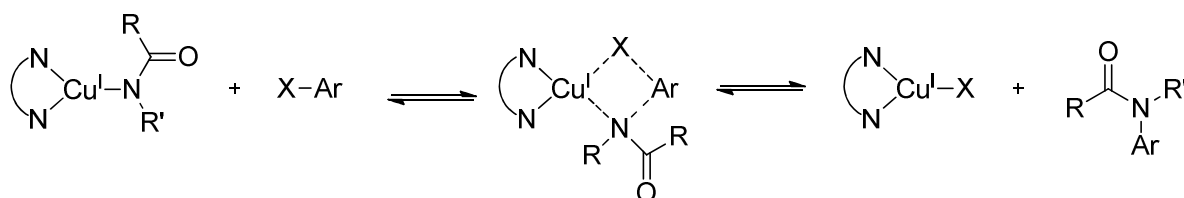
Wesentlich kostengünstiger als Palladium ist der Einsatz von Kupfer als Katalysator. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde von F. Ullmann erstmals über die Kupfer-vermittelte Biarylkupplung aus aromatischen Halogeniden berichtet.<sup>[123]</sup> Dabei werden stöchiometrische Mengen an Kupferpulver benötigt und die Durchführung erfordert hohe Temperaturen von über 200 °C, lange Reaktionszeiten sowie starke Basen. Die nur mäßigen Ausbeuten und die begrenzte Substratauswahl schränken die Anwendbarkeit zusätzlich ein. Diese Reaktion lässt sich auch zur Arylierung von Phenolen<sup>[124]</sup> oder Aminen<sup>[125]</sup> einsetzen und wurde 1906 erstmals katalytisch durchgeführt.<sup>[126]</sup> Die Kupplung mit Amiden wurde im folgenden Jahr vorgestellt und ist auch unter dem Namen Goldberg-Kupplung bekannt.<sup>[127]</sup> Etwa ein Jahrhundert später wurde diese Reaktion wiederentdeckt und die Kupplung katalytisch bei verminderter Temperatur mit Kupfer(I)iodid als Katalysator in Gegenwart von 1,10-Phenanthrolin als Ligand durchgeführt.<sup>[128]</sup> In einer Studie wurde dabei der Einfluss der Kupferquelle, des Diaminliganden sowie der Base/des Lösungsmittels untersucht und in diesem Zusammenhang Kupfer(I)iodid und ein *N,N'*-dimethyliertes 1,2-Diamin als bestes Katalysatorsystem identifiziert.<sup>[129]</sup> Bemerkenswert ist, dass die Reaktion relativ unabhängig von der Kupferquelle ist: auch elementares Kupfer oder Kupfer(II)salze können eingesetzt werden, wobei aber die Ausbeuten bei Einsatz von Kupfer(I)salzen signifikant höher sind. Es wird angenommen, dass unabhängig von der verwendeten Kupferquelle eine gemeinsame katalytisch wirksame Kupferspezies auftritt. Im Allgemeinen geht man von Kupfer(I)ionen aus.<sup>[130]</sup> Der genaue Mechanismus der Reaktion ist weitgehend unbekannt. Es werden aber verschiedene Reaktionspfade angenommen. Einer davon verläuft über die Bildung einer

Kupfer(III)spezies durch oxidative Addition des Arylhalogenids an das Kupfer(I)zentrum. Mittlerweile sind einige Metallkomplexe bekannt, die Kupfer in der Oxidationsstufe +3 enthalten.<sup>[131]</sup> Zwei mögliche Katalysezyklen sind in Schema 34 dargestellt. Im ersten Schritt wird bei beiden Cyclen die katalytisch aktive Spezies erzeugt. In einem der Cyclen wird das Cu(III)-Intermediat durch oxidative Addition des Arylhalogenids gebildet. Anschließend erfolgt der Austausch des Halogenids gegen das Nucleophil, in diesem Falle das Amid, und schließlich die reduktive Eliminierung unter Freisetzung des Kupplungsproduktes und Rückbildung des katalytisch aktiven Kupferkomplexes (**Reaktionspfad 2**). Bei **Reaktionspfad 1** erfolgt die Bildung des Kupferkomplexes und die oxidative Addition genau umgekehrt. Im Gegensatz zu Kreuzkupplungen mit Palladium ist im Falle von Kupfer-katalysierten Reaktionen die Reihenfolge von oxidativer Addition und die Anlagerung des Nucleophils unklar.<sup>[132]</sup> Allerdings scheint tendenziell der in Schema 34 dargestellte **Reaktionspfad 1** der plausible Mechanismus zu sein.



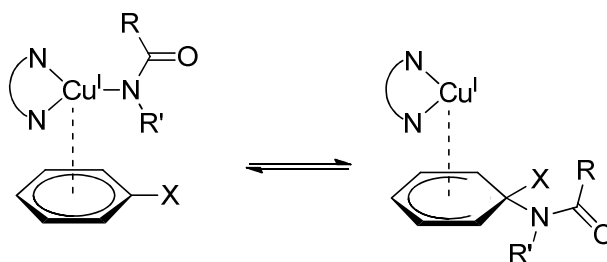
Schema 34 Mögliche Mechanismen der Kupfer-katalysierten Arylierung von Amid.

Ein anderer Ansatz geht von einem konzertierten Mechanismus mit einer sogenannten  $\sigma$ -Bindungsmetathese aus, bei der über einen Vierzentren-Übergangszustand zwischen dem Arylhalogenid und dem Kupfer-Amid-Addukt das Produkt und der Katalysator rückgebildet werden. Die Oxidationsstufe des Kupfers bleibt dabei unverändert. Zunächst wird das Amid durch Austausch gegen das Halogenid an das Metallzentrum koordiniert und anschließend ein  $\sigma$ -Komplex mit einem freien Elektronenpaar des Halogenids gebildet, wodurch die Aryl-Halogenid-Bindung polarisiert wird (Schema 35). Dadurch wird eine positive Ladung am *ipso*-C-Atom induziert und so der Angriff des Nucleophils erleichtert. Dieser Mechanismus wurde bereits 1964 von Bacon und Hill postuliert, die die Substitutionsreaktionen von Arylhalogeniden an Kupfersalze untersuchten.<sup>[133]</sup>



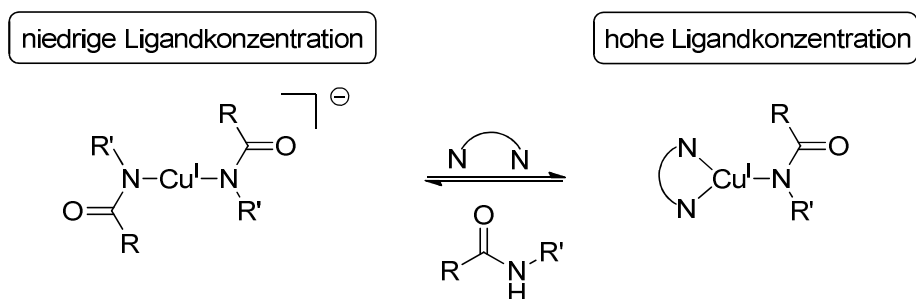
Schema 35 Kupfer-katalysierte Arylierung von Amiden über den  $\sigma$ -Bindungsmetathese-Mechanismus.

Ebenfalls 1964 stellte Weingarten ein ähnliches Konzept für die Aktivierung des Arylhalogenids vor.<sup>[134]</sup> Mittels kinetischer Studien zur Reaktion zwischen Brombenzol und Kaliumphenolat wurde angenommen, dass die Aktivierung in diesem Falle durch die Wechselwirkung zwischen dem Kupfer(I)zentrum mit den  $\pi$ -Elektronen des aromatischen Systems zustande kommt (Schema 36). Das Metall fungiert in diesem Falle als Elektronenfalle und verringert damit auch die Elektronendichte am *ipso*-C-Atom, wodurch die nucleophile Substitution vereinfacht wird. Unterstützt wird diese These durch Strukturaufklärung von Kupfer(I)-Benzol-Komplexen, welche eindeutig auf die Bildung von  $\pi$ -Komplexen hinweist.<sup>[135]</sup>



Schema 36 Bildung des  $\pi$ -Komplexes zwischen dem Kupferzentrum und dem aromatischen System.

Bei der Reaktion ist es weiterhin wichtig, die Menge des Liganden an den Katalysator anzupassen, da bei geringer Ligandenkonzentration eine unreaktive Katalysatorspezies gebildet wird (vgl. Schema 37). In Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der Diaminkonzentration eine Beschleunigung der Reaktion zur Folge hatte, während eine Erhöhung der Amidkonzentration genau den gegenteiligen Effekt zeigte.<sup>[136]</sup> Durch Buchwald konnte dabei nachgewiesen werden, dass sich ein Kupfer(I)amidkomplex bildet, welcher im NMR-Spektrum einen verbreiterten Signalsatz zeigte, der auf die Anwesenheit verschiedenartiger Oligomere zurückzuführen ist. Durch Zusatz des Diamins wird diese Aggregation unterdrückt.<sup>[137]</sup>

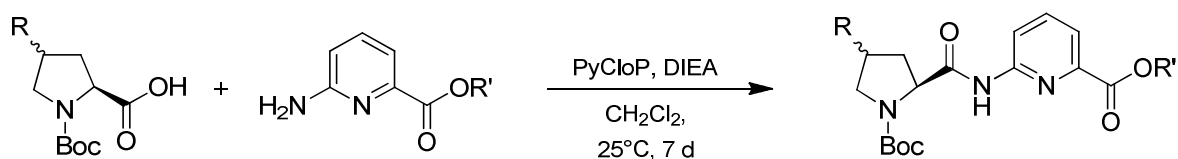


Schema 37 Vorgeschlagene Aggregation der Substrate bei Ligandenunterschuss.



## 5.2 Aufgabenstellung

Im Zuge meiner Doktorarbeit sollten Arbeiten durchgeführt werden, um die Synthesen der Cyclopeptide zu verbessern, da diese zum Teil langwierig sind und teure Kupplungsreagenzien erfordern. Insbesondere nimmt der Kupplungsschritt zum Dipeptid, der die elektronenarme 6-Aminopicolinsäure beinhaltet, viel Zeit in Anspruch und erfordert überstöchiometrische Mengen des Kupplungsreagenzes Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyCloP) (Schema 38). Alternativen zur herkömmlichen Kupplung könnten katalytische Methoden oder die native chemische Ligation<sup>[101]</sup> darstellen.



Schema 38    Herkömmliche Durchführung der Dipeptidkupplung.

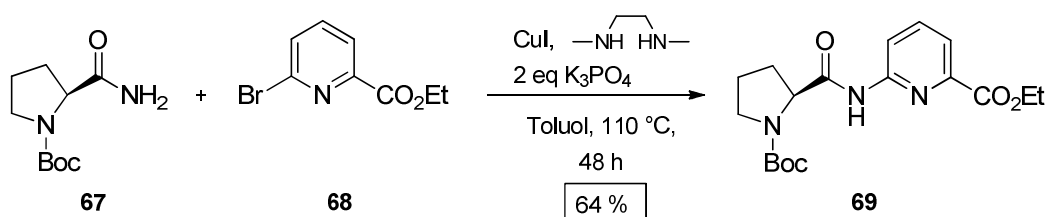
Aufgrund der Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen und der Tatsache, dass die Kupferkatalysatoren im Vergleich zu Palladium-basierten kostengünstiger sind, entschied ich mich, die Goldberg-Reaktion für die Dipeptidkupplung zu testen.

## 5.3 Ergebnisse

Die Goldberg-Kupplung wird durch die Anwesenheit von Sauerstoff empfindlich gestört. Gegebenenfalls werden dadurch Kupferoxide gebildet, die unreaktiv sind bzw. die Reaktion in eine ungewollte Richtung verschieben. Die Synthese muss daher unter inerten Bedingungen durchgeführt werden. Als Nebenreaktion können bei dieser Reaktion Homokupplungen des eingesetzten Arylhalogenids auftreten wie bei der Kupfer-vermittelten Biarylkupplung nach Ullmann.<sup>[123]</sup>

In einem ersten Versuch wurden die Bedingungen für die Umsetzung von unsubstituiertem Prolinamid mit 6-Brompicolinsäureethylester getestet. Sowohl das Boc-geschützte Prolinamid **67** als auch der 6-Brompicolinsäureethylester **68** sind ebenso wie die anderen Reagenzien kommerziell erhältlich. Als Katalysator wurde Kupfer(I)iodid mit *N,N'*-Dimethylethylen-

diamin als Liganden gewählt. In dieser Kombination wurden bei der Ullmann-Kupplung bisher die besten Resultate erzielt.<sup>[129]</sup> Kupfer(I)iodid sowie Kaliumphosphat wurden vor der Durchführung sorgfältig getrocknet und trockenes, entgastes Toluol als Lösungsmittel eingesetzt. Der Ligand wurde vor der Reaktion frisch destilliert, da dieser in der kommerziell verfügbaren Form lediglich als 85 %iges Gemisch mit *N*-Methylethylendiamin erhältlich war. Die Reaktion wurde schließlich unter Argonatmosphäre durchgeführt und nach 48 h abgebrochen. Nach Extraktion und anschließender Säulenchromatographie konnte das gewünschte Dipeptid **69** mit einer Ausbeute von 64 % als farbloser Feststoff erhalten werden (Schema 39).



Schema 39 Bildung des unsubstituierten Dipeptids mittels der Goldberg-Kupplung.

Mit der analysenreinen Substanz wurde anschließend ein Responsefaktor für die HPLC Analyse bestimmt. Hierfür wurden die Flächen der Peaks für **69** in den HPLC Chromatogrammen gegen die bekannte Konzentration der Verbindung aufgetragen.<sup>[138]</sup> Mit Hilfe dieses Responsefaktors konnten folgende Reaktionen nun in kleinem Maßstab und ohne Aufarbeitung durchgeführt werden.

In diesen Reaktionen wurde der Einfluss des Lösungsmittels, der Base sowie der Reaktionsdauer auf die Ausbeute der Reaktion untersucht. In diesem Zusammenhang wurden zunächst sechs Reaktionen angesetzt, in denen die Lösungsmittel und Basen variiert wurden. Alle Lösungsmittel wurden ebenso wie die Basen vor ihrem Einsatz getrocknet und der Ligand ebenfalls frisch destilliert. Die einzelnen Kombinationen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12 Zusammensetzung der verschiedenen Reaktionen.

Lösungsmittel	Base	Katalysatormenge
Toluol	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 mol%
	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 mol%
	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 mol%
Dioxan	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 mol%
	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 mol%
	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 mol%

Als Kupferquelle wurde Kupfer(I)iodid verwendet, da dieses schon in der ersten von mir durchgeführten Katalysereaktion gute Ausbeuten lieferte. Bei Verwendung von Kaliumphosphat wurde die Katalysatormenge auf 10 mol% erhöht. Diese Vorgaben wurden der Literatur entnommen, in der von schlechten Ausbeuten bei der Verwendung sterisch ungehinderter, in erster Linie primärer Amide bei der Kupplung mit Arylbromiden berichtet wurde.<sup>[129]</sup>

Die Reaktionen wurden für einen Tag bei 110 °C gerührt. Dann wurden Proben entnommen, anschließend für weitere 24 h bei 110 °C gerührt gelassen und erneut Proben der Reaktionslösungen gezogen. Die Proben wurden mittels HPLC analysiert und die Ausbeuten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

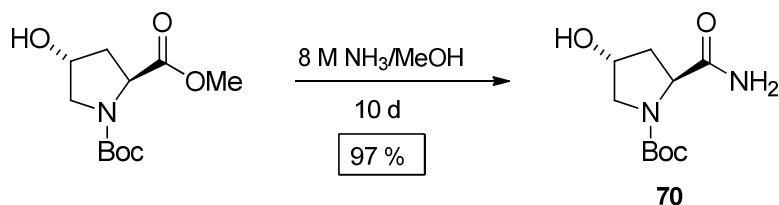
Tabelle 13 Ausbeuten der Katalyse für **69** unter den verschiedenen Bedingungen.

	Ausbeute nach 24 h / %		Ausbeute nach 48 h / %	
	Toluol	Dioxan	Toluol	Dioxan
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	68	19	68	19
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	64	-	64	-
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1	5	17	5

Wie in Tabelle 13 ersichtlich, scheint Dioxan als Lösungsmittel für die Kupplung zwischen Prolin **67** und Picolinsäure **68** wenig geeignet zu sein. Als Base bewährte sich in den Untersuchungen Kaliumcarbonat und eine Verlängerung der Reaktionszeit hatte keinen signifikanten Auswirkungen auf die Ausbeute. Im Anschluss wurde noch eine dritte Lösungsmittelvariation in Betracht gezogen, welche auch bei gewöhnlichen Kupplungen in unserem Arbeitskreis eingesetzt wird. Dafür wurde eine Reaktion in trockenem, entgastem DMF angesetzt und die Bedingungen ähnlich den bereits publizierten gewählt.<sup>[139]</sup> Im Gegensatz zur

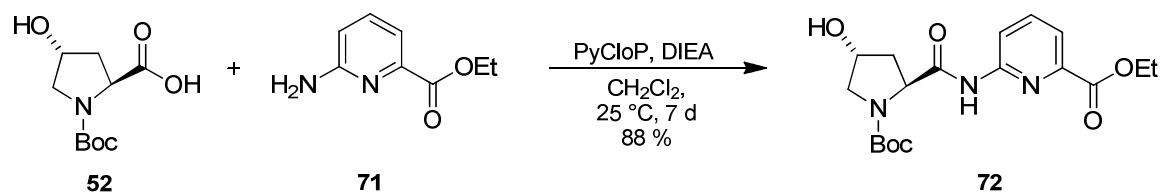
Publikation, in der Pipecolinsäure als Ligand eingesetzt wurde, wurde *N,N'*-Dimethylethylen-diamin beibehalten. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen keine Produktbildung beobachtet werden.

Nachdem gewährleistet war, dass die Kupplung unter den gewählten Bedingungen funktioniert, wurde die Reaktion auf den Einsatz von Hydroxyprolin übertragen. Für diese Untersuchung musste das Boc-geschützte Hydroxyprolinamid **70** zunächst synthetisiert werden. Die Synthese erfolgte dabei ausgehend von dem entsprechenden Methylester durch Rühren in 8 M methanolischer Ammoniak-Lösung (Schema 40) über eine Zeitdauer von 10 Tagen.<sup>[140]</sup> Die Ammoniak-Lösung wurde vorher durch Einleiten von gasförmigem Ammoniak in trockenes Methanol hergestellt.



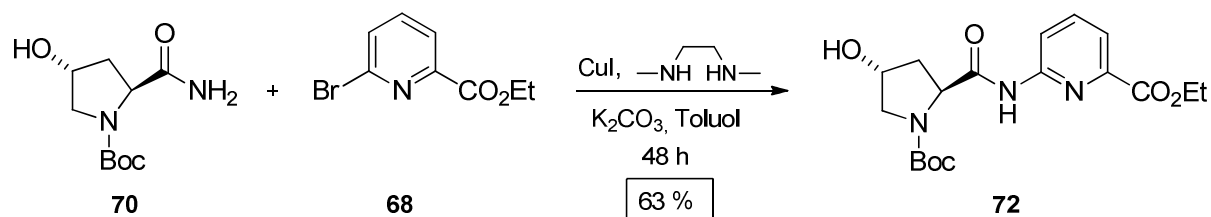
Schema 40 Synthese von Boc-Hyp-NH<sub>2</sub> **70**.

Um eine Aussage über die Eigenschaften des Dipeptids **72** treffen zu können sowie zum späteren Vergleich der verschiedenen Reaktionen, wurde **72** zunächst auf herkömmliche Weise unter Zuhilfenahme des Kupplungsreagenzes PyCloP synthetisiert (Schema 41). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Dipeptid **72** mit einer Ausbeute von 88 % als farbloser Schaum erhalten werden.



Schema 41 Darstellung des Dipeptids **72** mittels eines Kupplungsreagenzes.

Anschließend wurde die katalytische Darstellung von **72** durchgeführt, welche in Schema 42 dargestellt ist. Bei dieser wurde wie in den vorherigen Ansätzen Toluol als Lösungsmittel und Kaliumcarbonat als Base eingesetzt. Die erhaltene Ausbeute ist vergleichbar mit der, die bei der Reaktion mit dem Boc-geschützten Prolinamid beobachtet wurde.



Schema 42    Synthese von **72** durch Ullmann-Kupplung.

Weitere Optimierungsarbeiten wurden von M. Schaubel im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit unter meiner Anleitung durchgeführt.<sup>[141]</sup> Er untersuchte den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Ausbeute der Kupplung. Dabei wurden Lösungsmittel, Kupferquelle, Ligand sowie die Base variiert. Als bestes System konnte er eine Mischung aus reinem Kupfer als Katalysator, 99%igen *N,N'*-Dimethylethylenediamin und Kaliumcarbonat in Toluol identifizieren. Die resultierende Ausbeute konnte aber die, die ich bei meinen Untersuchungen erhalten habe (vgl. Tabelle 13), nicht übertreffen.

## 5.4 Diskussion

Mit 63 % liegt die Ausbeute der Synthese von **72** durch Goldberg-Kupplung unter der, die bei der Kupplung des Boc-geschützten Hydroxyprolin mit 6-Aminopicolinsäurethylester in Gegenwart von PyCloP beobachtet wurde. Berücksichtigt man aber, dass PyCloP in einer zweistufigen Synthese und 6-Aminopicolinsäureester in einer dreistufigen Reaktion hergestellt werden müssen, die für das katalytische Verfahren verwendeten Edukte aber kommerziell erhältlich bzw. in einem einstufigen Verfahren zugänglich sind, fällt der Vergleich der Kosten der beiden Verfahren klar zugunsten der katalytischen Reaktion aus.

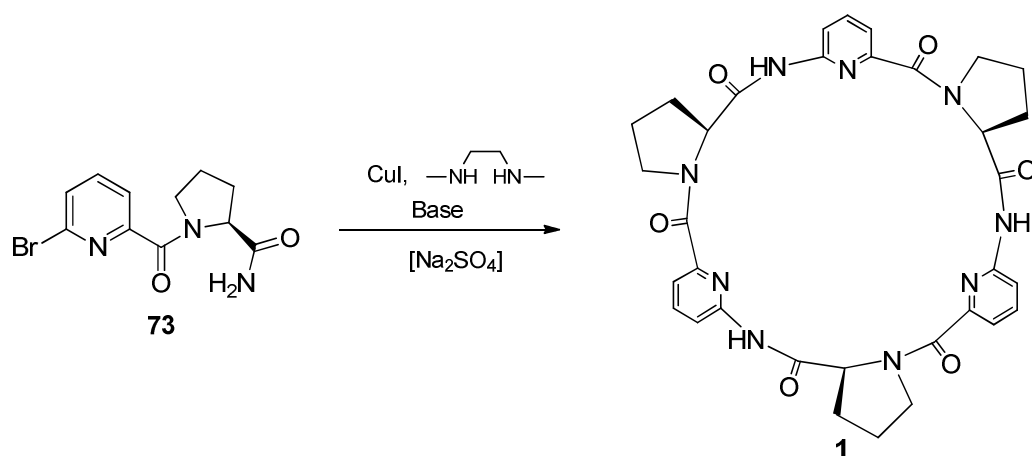
### 5.5 Zusammenfassung

Es konnte ein vereinfachter synthetischer Zugang zu einem zentralen Baustein der anionenbindenden Cyclopeptide, nämlich dem Dipeptid aus Prolin bzw. Prolinderivaten und 6-Aminopicolinsäure erarbeitet werden. Normalerweise erfolgt die Synthese dieser Verbindung aus entsprechend geschützten Aminosäureuntereinheiten mit einem Kupplungsreagenz, in den meisten Fällen PyCloP. Die Reaktion ist darum mit einer schlechten Atomökonomie und einer erhöhten Menge an Abfall verbunden. Bei dem hier entwickelten katalytischen Verfahren, das auf der Goldberg-Kupplung beruht, werden kommerzielle Edukte eingesetzt, die innerhalb von 24 h mit einer befriedigenden, wenn auch etwas geringeren Ausbeute als beim herkömmlichen Verfahren (68 % im Vergleich zu 88 %) zu den Produkten umgesetzt werden können. Bei der Peptidkupplung in Gegenwart von PyCloP betrug die Reaktionszeit sieben Tage. Ein weiterer Vorteil der Goldberg-Kupplung ist, dass keine Aktivierung einer Carbonsäure erfolgt und diese Reaktion daher nicht mit der Gefahr einer Racemisierung des chiralen Aminosäurebausteins verbunden ist. Alle diese Vorteile machen die Goldberg-Kupplung zu einer attraktiven Alternative für die Synthese der für unsere Cyclopeptide benötigten Dipeptidkomponenten.

### 5.6 Ausblick

Zukünftige Arbeiten könnten sich mit einer weiteren Verbesserung der Goldberg-Kupplung befassen. Durch Einsatz von Mikrowellen konnten z.B. bei der Synthese von *N*-Arylpiperazinonen, -piperazindionen und -3,4-dihydrochinolinonen bereits nach 20 bis 40 Minuten gute Ausbeuten der Produkte erhalten werden.<sup>[142]</sup> Auch die Synthese des Amids **70** ist mit einer Reaktionsdauer von zehn Tagen sehr langwierig und könnte gegebenenfalls durch Durchführung der Reaktion unter erhöhtem Druck in einem Autoklaven verbessert werden.

Es fehlt zudem noch der Nachweis, dass die Goldberg-Kupplung eine geeignete Methode von Dipeptiden darstellt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zu untersuchen, ob der Baustein **73** in einem Schritt durch Oligomerisierung und Cyclisierung in das unsubstituierte Cyclopeptid **1** überführt werden kann (Schema 43). Dies würde die Synthese dieser Verbindung deutlich verbessern. Gegebenenfalls können in dieser Reaktion Templateffekte geeigneter Anionen ausgenutzt werden.

Schema 43 Darstellung von **1** ausgehend von dem Prolinderivat **73**.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Apparatives

#### $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

*Bruker Avance 600 (600 MHz)*

*Bruker Avance DRX 400 (400 MHz)*

*Bruker Avance DRX 200 (200 MHz)*

Die chemischen Verschiebungen werden gemäß der  $\delta$ -Skala in ppm relativ zum Signal des jeweiligen Lösungsmittels angegeben.

$$^1\text{H}: \quad \delta (\text{CDCl}_3) = 7.26, \delta (\text{D}_2\text{O}) = 4.80, \delta (\text{MeOD}) = 3.31, \delta (\text{DMSO-}d_6) = 2.50, \\ \delta (\text{Aceton-}d_6) = 2.05, \delta (\text{Acetonitril-}d_3) = 1.94$$

Die Multiplizitäten der Signale werden durch folgende Abkürzungen wiedergegeben:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett und m = Multiplett, br = breites Signal.

Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) ohne Berücksichtigung des Vorzeichens angegeben. Aromatische Signalgruppen werden, wenn keine differenziertere Zuordnung möglich ist, durch Ar-H bzw. Ph-H gekennzeichnet.

#### $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

*Bruker Avance 600 (151 MHz)*

Die chemischen Verschiebungen werden gemäß der  $\delta$ -Skala in ppm relativ zum Signal des jeweiligen Lösungsmittels angegeben.

$$^{13}\text{C}: \quad \delta (\text{CDCl}_3) = 77.03, \delta (\text{DMSO-}d_6) = 39.95$$

#### $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie

*Bruker Avance 600 (376 MHz)*

#### Massenspektrometrie

*Bruker Ultraflex TOF/TOF (MALDI/TOF)*

Die Vorbereitung der Probe erfolgte durch Mischen der gelösten Substanz mit Trifluoressigsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix auf einer Trägerplatte.

*Bruker-Quadropol-MS: Esquire 3000*

Als Bedingungen für die ESI-Messungen wurden folgende Einstellungen gewählt: drying temperatur: 300 °C; sample flow: 120  $\mu\text{l/h}$ ; HV capillary: 4000 V; HV end plate offset: -500.



<u>IR</u>	<i>Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Spectrum 1000</i>
<u>C,H,N-Analyse</u>	<i>Elementar vario Micro cube</i>
<u>HPLC</u>	<i>Dionex P680 HPLC Pumpe, ASI-100 Autosampler, TCC-100 Säulenofen, UVD 170U UV/Vis Detektor, Chromeleon V6.70 Software</i>
<u>Säulen</u>	<i>Agilent Eclipse® XDB-C8, 4.6 x 150 mm, 5 µm</i>  <i>Supelco Ascentis® C18, 21.2 mm x 25 cm, 5 µm</i>
<u>Semipräp. HPLC</u>	<i>Dionex Ultimate 3000</i>
<u>Säule</u>	<i>Supelco Ascentis C18, 21.2 mm x 25 cm, 5 µm</i>
<u>Säulenchromatographie</u>	<i>Kieselgel 63-200 (60 Å) von MP SiliTech</i>  <i>Kieselgel 60 (230-400 Mesh ASTM) von Merck</i>  <i>Lobar® Fertigsäule von Merck, Größe B (310-25)</i> <i>Lichroprep®RP-8 (40-63 µm)</i>  <i>Lobar® Fertigsäule von Merck, Größe A (240-10)</i> <i>Lichroprep® RP-18 (40-63 µm)</i>
<u>Dünnschichtchromatographie</u>	<i>Kieselgel 60 F<sub>254</sub> auf Aluminumträger (Merck)</i> <i>RP-8 F<sub>254</sub> auf Glasträger (Merck)</i>
Zur Detektion wurden die Fluoreszenzlösungen bei 254 nm, die Anregung der Eigenfluoreszenzen bei 366 nm sowie das Färbeverhalten gegenüber Ninhydrinlösung genutzt.	
<u>Isotherme Titrationskalorimetrie</u>	<i>MicroCal VP-ITC, ITC Data Analysis Origin V7.0 Software</i>
<u>Schmelzpunktbestimmung</u>	<i>Müller SPM-X300</i>
<u>Drehwertbestimmung</u>	<i>Perkin Elmer 241 MC Polarimeter</i>
<u>pH-Wertbestimmung</u>	<i>Metrohm 691 pH Meter</i>  <i>Mettler-Toledo MP-120 pH-meter</i>

### Potentiometer

*pH-Meter: Crison micropH 2002, Bürette: Crison 738, Referenzelektrode: Ingold Ag/AgCl mit 0.5 M NaCl, Messelektrode: Orion mod 91-01, Thermostat: Hawk EKS.1, Magnetrührer: Crison microstirrer 2038, Computer: PC386 mit einem 387-Coprozessor*

### UV/Vis-Spektrometer

*Shimadzu UV-2501PC  
Varian Cary 100 Bio spectrometer*

### Reinstwasser

*Barnstead EASYPure® RoDi Thermo Scientific*

### Dosierung

*Hamilton, gasdichte Spritzen  
Infusors AG, Perfusor Precidor HAT*

## 6.2 Chemikalien

Folgende Edukte für die Synthese der Peptide sind kommerziell erhältlich und wurden von den in Klammern genannten Quellen bezogen: H-Hyp-OH (ABCR), H-Hyp-OMe (Novabiochem), Z- $\beta$ -Ala-OH (Acros), H- $\beta$ -Ala-OMe (Novabiochem), 6-Aminopicolin (Alfa Aesar). Die Kupplungsreagenzien TBTU (Novabiochem), EDC (ABCR) sowie das zur Aktivierung eingesetzte Pentafluorphenol (Alfa Aesar) können ebenfalls käuflich erworben werden. Die für die Modifikation der Aminosäurebausteine erforderlichen Chemikalien, wie Diisopropylazodicarboxylat (Merck), Thiobenzoessäure (Acros) oder 1,2-Ethandithiol (Fluka) wurden ebenfalls über den Handel bezogen. Für die Versuche zur Goldberg-Kupplung wurden das Prolinamid (ABCR) und 6-Brompicolinsäureethylester (fluorochem) ebenso wie der Ligand *N,N'*-Dimethylethylendiamin (Aldrich) und der Katalysator Kupfer(I)iodid (Aldrich) gekauft. Das Boc-geschützte Prolinamid **67** wurde von ABCR bezogen. Die für die Untersuchung der Iminbildung benötigten Reagenzien tren und Pyridin-2-carbaldehyd wurden bei ABCR erworben.

Andere verwendete Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders vermerkt, wie erhalten eingesetzt. Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden getrocknet.

## 6.3 Messungen

### 6.3.1 ITC-Messungen

Als Lösungsmittel für die ITC-Messungen diene neben Methanol (HPLC grade) v.a. entionisiertes Wasser aus der Reinstwasseranlage, welches vor der Durchführung frisch entnommen wurde. Es wurde entweder ein 1:1-Gemisch aus Methanol und Wasser oder reines Wasser teilweise mit gelösten Puffersalzen eingesetzt. Um exakte Konzentrationen zu gewährleisten, wurde das Lösungsmittel vor der Messung nicht zusätzlich entgast. Die Gastlösungen wurden jeweils in der 20-fachen Konzentration in Bezug auf die Rezeptorlösungen eingesetzt, damit die Sättigung der Bindungsisothermen erreicht werden kann. Je nach Stärke der Bindung betrug die Cyclopeptidkonzentration entweder 1 mM oder 2.5 mM. Für eine Messung wurde der Rezeptor in der Messzelle vorgelegt (1.4584 ml) und der Gast über eine Hamiltonspritze in insgesamt 30 Schritten zugegeben. Die erste Injektion erfolgte 5 min nach der erfolgreichen Equilibrierung und enthielt 2 µl. Diese wurde bei der Auswertung ignoriert. Die folgenden 29 Injektionen bestanden aus jeweils 8 µl mit einem zeitlichen Abstand zwischen zwei Zugaben von 180 s (Zugabegeschwindigkeit von 0.5 µl/sec) (Abb. 76). Zur Auswertung wurde als Referenzmessung die Verdünnungswärme der Titration des Salzes in das reine Lösungsmittelgemisch verfolgt und diese Messung von der Messung der Wirt/Gast Titration abgezogen.

The screenshot displays the 'ITC Controls' software interface, which is organized into several sections:

- Experimental Parameters:**
  - Total # Injections: 30
  - Cell Temperature (°C.): 25
  - Reference Power (µCal/sec.) [1 - 34.8]: 30
  - Initial Delay (sec.): 300
  - Syringe Concentration (mM): 20
  - Cell Concentration (mM): 1
  - Stirring Speed: 307
  - Data File Name: default.itc
  - Feedback Mode/Gain: ☒ None, ☐ Low, ☐ High
  - ITC Equilibration Options: ☐ No Check Temp., ☒ Fast Equil., ☒ Auto
  - Data File Comments: (empty text area)
- Injection Parameters:**
  - Volume (µl): 2
  - Duration (sec.): 4
  - Spacing (sec.): 180
  - Filter Period (sec.): 2
  - Edit Mode: ☒ All Same, ☒ Unique, ☐ Apply To Rest
  - Table of injection parameters:
- Pipette Controls:**
  - Buttons: Open Fill Port, Close Fill Port, Purge->ReFill
  - Distance (in.): 0.1
  - Buttons: Up, Dn

	Volume	Duration	Spacing	Filter
1	2.0	4.0	180	2
2	8.0	16.0	180	2
3	8.0	16.0	180	2
4	8.0	16.0	180	2

Abb. 76: Experimentelle Parameter der ITC Messungen.

Die Auswertung der erhaltenen Kurve erfolgte mit Hilfe von Origin 7.0 in der von MicroCal angepassten Version. Als Bindungsmodell wurde bei allen Messungen “one set of sites“ für die Analyse von 1:1 Komplexen zugrunde gelegt. Bei Bindungskonstanten  $K < 10000 \text{ M}^{-1}$  wurde der Stöchiometriefaktor  $n$  während der Regression nicht angepasst, sondern auf 1 festgelegt. Bei Bindungskonstanten  $K \geq 10000 \text{ M}^{-1}$  wurde der Stöchiometriefaktor  $n$  während der Regression variabel gelassen und mit angepasst. Für die Bindungsstudien wurden mindestens drei voneinander unabhängige Messungen durchgeführt und daraus die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen gebildet.

### 6.3.2 Potentiometrische Messungen

Der Aufbau für die Durchführung der potentiometrischen Titrationen ist in Abb. 77 dargestellt.

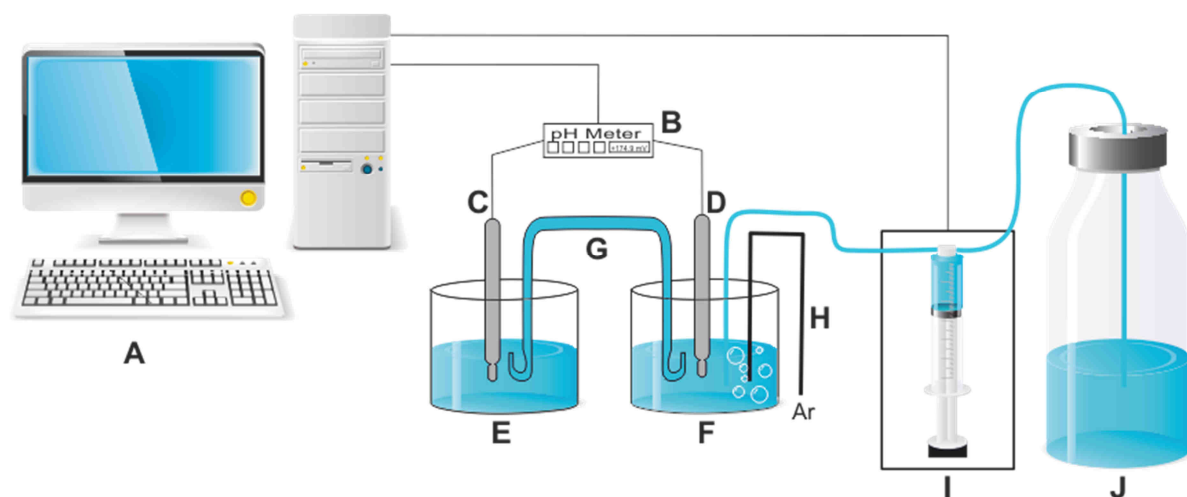


Abb. 77: Aufbau einer potentiometrischen Titrierapparatur.

---

Komponenten	<b>A</b>	Computer zur Auswertung
	<b>B</b>	pH-/Voltmeter
	<b>C</b>	Referenzelektrode
	<b>D</b>	Messelektrode
	<b>E</b>	Referenzzelle
	<b>F</b>	Messzelle
	<b>G</b>	Salzbrücke
	<b>H</b>	Argonleitung
	<b>I</b>	automatische Bürette
	<b>J</b>	Natronlauge (0.1 M)

Alle potentiometrischen Titrationsen erfolgten unter einer Schutzatmosphäre durch Einleiten von Argon, um eine Verfälschung durch gelöstes Kohlendioxid zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde zum Ansetzen der Stammlösungen carbonatfreies Wasser verwendet. Als Elektrolyt wurde Natriumchlorid in einer Konzentration von 0.15 M eingesetzt, da das Cyclopeptid **2** als Hydrochloridsalz eingesetzt wurde und somit bereits Chloridionen in dem zu untersuchenden System vorliegen. Die Untersuchungen wurden alle bei einer konstanten Temperatur von 298.1 K, welche durch Einsatz eines Thermostat realisiert wurde, ständigem Rühren unter einer inerten Atmosphäre und bei unveränderter Ionenstärke durchgeführt. Die Auswertung der Titrationskurven erfolgte mit dem Programm PASAT.<sup>[143]</sup>

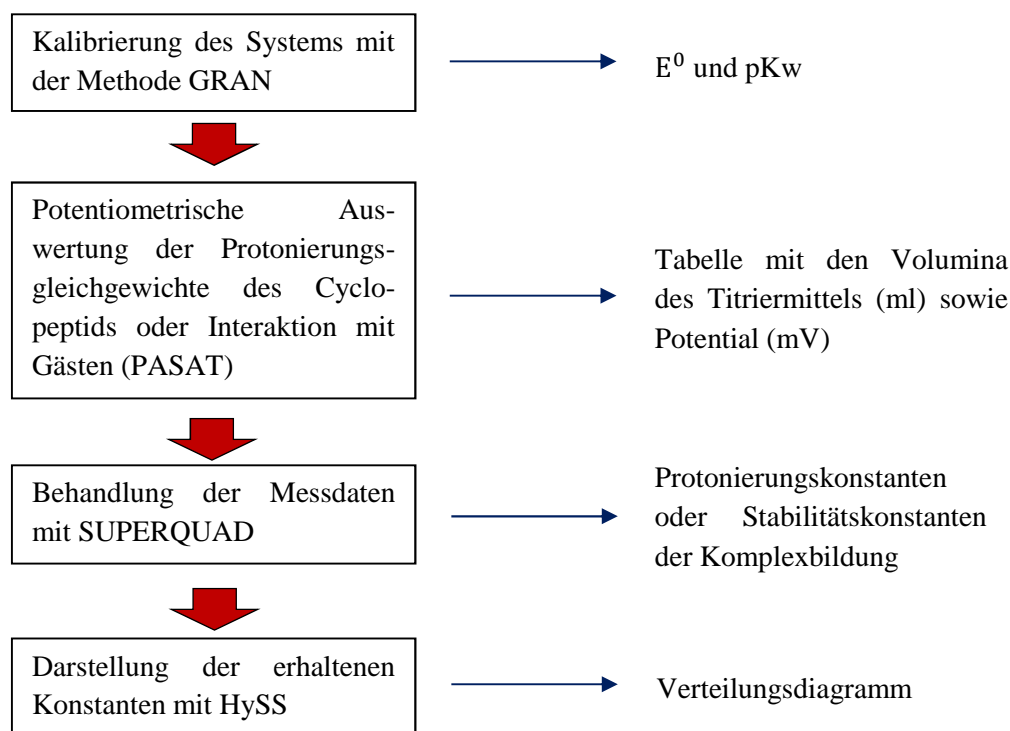


Abb. 78: Flussdiagramm des Ablaufs und Auswertung einer potentiometrischen Titration.

Die Auswertung der Elektrodenkalibrierung und damit das Standardelektrodenpotential sowie das Ionenprodukt des Wassers wurde mit der Methode nach Gran durchgeführt.<sup>[144]</sup> Hierbei wurde Salzsäure (0.1 M) mit Natronlauge (0.1 M) titriert. Anschließend wurden die eigentlichen Titrations durchgeföhrt und dabei die Differenz des Potentials bzw. der pH-Wert gegen das Volumen des Titriermittels aufgetragen. Die Bestimmung der stufenweisen Protonierungskonstanten aus den entsprechenden Daten erfolgte durch ein mathematisches Anpassungsverfahren nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus, wie es in dem Programm SUPERQUAD enthalten ist.<sup>[145]</sup> Die pH-Wert-Abhängigkeit der Protonierungsgleichgewichte wurde mittels geeigneter Verteilungsdiagramme unter Verwendung des Programms HySS dargestellt (Abb. 78).<sup>[146]</sup>

Für die Messungen wurden ungefähr 20 mg des Cyclopeptids in einer wässrigen Natriumchloridlösung (0.15 M) gelöst (30 ml), wobei pH 4.2 resultierte. Anschließend wurde mit Hilfe einer automatischen Bürette der Titrant in 10  $\mu$ l Schritten zugegeben und kontinuierlich die Änderung des Potentials zwischen Mess- und Bezugselektrode aufgezeichnet. In Abb. 79 ist eine typische Titrationskurve von 2 mit 0.1 M Natronlauge dargestellt. Man findet nur

einen Wendepunkt in der Kurve, was dafür spricht, dass die  $pK_s$ -Werte sehr nah beieinander liegen.

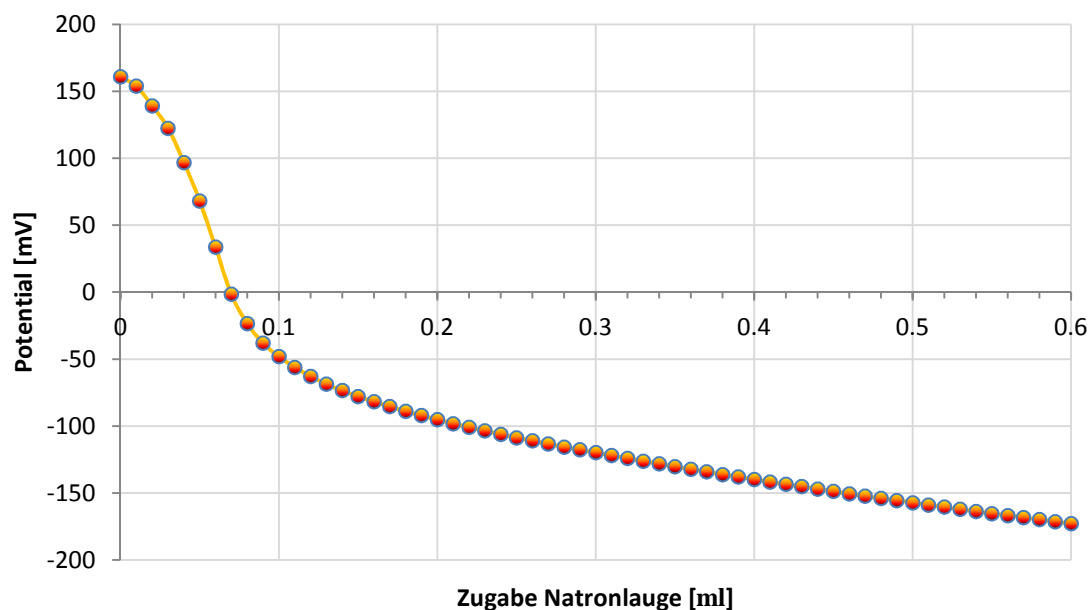


Abb. 79: Potentiometrische Titrationskurve für das Cyclopeptid **2** mit Natronlauge in einer 0.15 M wässrigen Natriumchloridlösung bei 298.1 K.

Die Titrationsen wurden in Wasser bei  $298.1 \pm 0.1$  K durchgeführt. Das Wasser wurde vor der Benutzung zweimal destilliert und über eine Millipore Apparatur filtriert. Die Aufzeichnung der Werte erfolgte mit dem Programm PASAT. Als Referenzelektrode diente bei den Studien eine Ag/AgCl Elektrode mit einer gesättigten KCl Lösung. Die Glaselektrode wurde über die Wasserstoffionenkonzentration durch Titration standardisierter Mengen von HCl mit  $\text{CO}_2$ -freier Natronlauge kalibriert. Durch Bestimmung des Wendepunktes dieser Messung nach der Methode nach Gran wurde so das Standardpotential  $E^0$  und  $pK_W$  erhalten.

Mit Hilfe des Programmes HYPERQUAD wurden die Protonierungs- sowie Stabilitätskonstanten berechnet und das Verteilungsdiagramm über HySS dargestellt. Der pH ( $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ ) wurde über einen Bereich von 3 – 12 aufgenommen. Auch hier wurden mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt, welche zunächst unabhängig voneinander ausgewertet und anschließend miteinander verglichen wurden. Da keine starken Abweichungen gefunden wurden, wurden die einzelnen Datensätze kombiniert und gleichzeitig behandelt, um so die finalen Bindungskonstanten zu erhalten.

Für die einzelnen Messungen wurden ungefähr 20 mg des Cyclopeptids in die temperierte Messzelle eingewogen, in der Elektrolytlösung (30 ml) gelöst und nach Bedarf etwas HCl (0.1 M) zudosiert. Die Elektrolytlösung sowie die HCl wurden vor der Messung frisch angesetzt. Je nach Art der Messung wurden zudem zwei Äquivalente Natriumsulfat zugegeben. Anschließend wurde die carbonatfreie Natronlauge (0.1 M) in 10  $\mu$ l Schritten bis zu einem Volumen von 0.6 ml zutitriert.

### 6.3.3 UV-Titrationsen

Das Absorptionsspektrum wurde mit Hilfe eines *Varian Cary 100 Bio Spektrometers* bei 298.1 K in Quarzküvetten (1 cm) aufgenommen. Als Lösungsmittel für die ersten Analysen diente wie bei den potentiometrischen Titrationsen eine 0.15 M Natriumchloridlösung, welche auch hier mit Millipore Wasser angesetzt wurde. Mit dieser wurde eine 0.1 mM Lösung des Cyclopeptids angesetzt und von dieser Lösung dann das UV-Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 190 – 1100 nm aufgenommen. Die Einstellung des pH-Wertes wurde durch Zugabe von verdünnter Natronlauge bzw. Salzsäure erreicht.

Für die einzelnen Messungen wurde der Stammlösung jeweils die erforderliche Menge entnommen, die nötig war, um die Küvette zu füllen, und diese nach Aufnahme des betreffenden Spektrums wieder zu der Lösung zurück gegeben. Im nächsten Schritt wurde nun der pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge erhöht. Aufgrund der geringen Mengen konnte die Konzentrationsänderung dabei vernachlässigt werden. Auf diese Weise wurden insgesamt 25 Spektren in einem pH-Bereich von 1 – 11 aufgenommen. Entsprechendes galt für die Aufnahme der UV-Spektren in Anwesenheit von 1.5 equiv Natriumsulfat. Die zugehörigen pH-Werte sowie Volumina können aus der folgenden Tabelle 14 entnommen werden.



Tabelle 14     pH-Werte sowie Volumina der Säure bzw. Base der einzelnen UV-Titrationsen in An- und Abwesenheit von Natriumsulfat

Messung	Ohne Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			1.5 equiv Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
	pH	Zugabe / $\mu$ l		pH	Zugabe / $\mu$ l	
1	1.27	50.0	HCl	1.11	30.0	HCl
2	1.52	16.0	NaOH	1.42	20.0	NaOH
3	1.81	7.0	NaOH	1.85	10.0	NaOH
4	2.19	4.0	NaOH	2.07	10.0	NaOH
5	2.80	3.0	NaOH	2.43	21.0	NaOH
6	3.25	2.0	NaOH	2.67	25.0	NaOH
7	4.11	1.0	NaOH	2.90	5.0	NaOH
8	4.49	0.6	NaOH	3.46	5.0	NaOH
9	5.06	0.1	NaOH	3.68	7.0	NaOH
10	5.47	0.2	NaOH	4.39	9.0	NaOH
11	5.92	0.5	NaOH	4.80	12.0	NaOH
12	6.43	0.1	NaOH	5.44	0.4	NaOH
13	6.70	0.3	NaOH	5.95	0.4	NaOH
14	7.00	1.3	NaOH	6.60	0.3	NaOH
15	7.33	0.3	NaOH	7.00	0.3	NaOH
16	7.72	0.7	NaOH	7.19	0.4	NaOH
17	8.09	0.7	NaOH	7.71	0.4	NaOH
18	8.31	0.6	NaOH	8.20	0.4	NaOH
19	8.65	1.3	NaOH	8.63	0.8	NaOH
20	8.98	2.0	NaOH	8.96	1.2	NaOH
21	9.14	2.0	NaOH	9.34	2.0	NaOH
22	9.47	2.5	NaOH	9.85	3.5	NaOH
23	9.83	4.0	NaOH	10.25	4.5	NaOH
24	10.12	4.5	NaOH	10.69	10.0	NaOH
25	10.37	5.0	NaOH	11.08	20.0	NaOH
26	10.95	19.0	NaOH	0.55	140.0	NaOH
27	0.70	73.0	NaOH	-	-	-

Abschließend wurde eine weitere Titration in Gegenwart von Natriumsulfat bei einem festen pH von  $4.80 \pm 0.05$  durchgeführt. Hier wurde ebenfalls eine 0.1 mM Lösung des Cyclopeptids (5 ml) in reinem Millipore-Wasser vorbereitet. Zu dieser wurde eine 75 mM Natriumsulfat-Lösung zunächst in 0.5  $\mu$ l Schritten, also entsprechend 0.075 equiv pro Zugabe, zutitriert. Nachdem etwas mehr als 2 equiv in der Lösung vorlagen, wurde größere Volumina der Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung, nämlich 10  $\mu$ l zugesetzt (Tabelle 15). Der pH-Wert wurde während der Messung durch Zugabe von verdünnter Natronlauge bzw. Salzsäure konstant gehalten.

Tabelle 15 UV-Titration des Cyclopeptids **15** mit Natriumsulfat bei pH 4.8; angegeben sind die Volumina der Gastlösung inkl. der Äquivalente sowie der Base/Säure.

Messung	Zugabe / $\mu\text{l}$ $\text{Na}_2\text{SO}_4$	Stoffmenge / $\mu\text{mol}$	equiv	pH-Wert	Zugabe / $\mu\text{l}$ NaOH/HCl
1	-	0.000	0.000	4.80	1.0
2	0.5	0.038	0.075	4.77	1.5
3	0.5	0.075	0.150	4.83	-
4	0.5	0.113	0.226	4.79	0.1
5	0.5	0.150	0.301	4.82	-
6	0.5	0.188	0.376	4.77	0.1
7	0.5	0.225	0.451	4.80	-
8	0.5	0.263	0.526	4.76	0.1
9	0.5	0.300	0.601	4.77	-
10	0.5	0.338	0.677	4.79	-
11	0.5	0.376	0.752	4.79	-
12	0.5	0.413	0.827	4.81	-
13	0.5	0.451	0.902	4.79	-
14	0.5	0.488	0.977	4.76	0.4
15	0.5	0.526	1.052	4.75	1.4
16	0.5	0.563	1.128	4.77	-
17	0.5	0.601	1.203	4.79	-
18	0.5	0.638	1.278	4.81	-
19	0.5	0.676	1.353	4.84	-
20	0.5	0.713	1.428	4.75	0.1
21	0.5	0.751	1.503	4.76	-
22	0.5	0.789	1.579	4.77	-
23	0.5	0.826	1.654	4.79	-
24	0.5	0.864	1.729	4.82	-
25	0.5	0.901	1.804	4.83	-
26	0.5	0.939	1.879	4.84	-
27	0.5	0.976	1.954	4.85	-
28	10	1.014	2.030	4.76	1.3
29	10	1.765	3.533	4.82	-
30	10	2.516	5.036	4.83	-
31	10	3.267	6.540	4.84	-
32	10	4.018	8.043	4.77	0.9
33	10	4.769	9.547	4.79	-
34	10	5.520	11.050	4.82	-
35	10	6.271	12.554	4.83	-
36	10	7.022	14.057	4.85	-
37	10	7.773	15.560	4.78	1.3
38	10	8.524	17.064	4.79	-
39	10	9.275	18.567	4.81	-
40	10	10.026	20.071	4.83	-

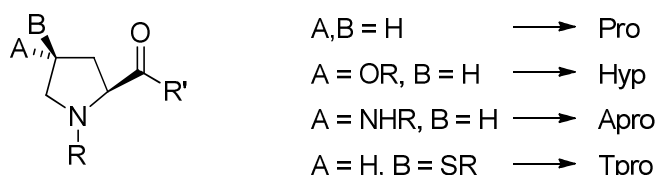
## 6.4 Synthesen

### 6.4.1 Allgemeines

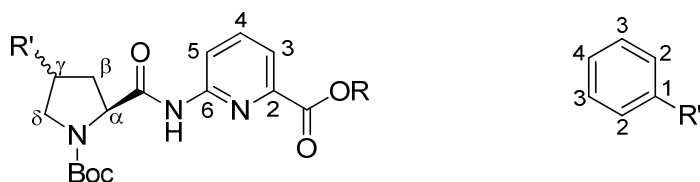
Zur Benennung der hergestellten Peptide wird folgende Systematik verwendet:

- es wird ein Code für die verwendeten Aminosäuren benutzt (z.B. Pro = Prolin, Apa = Aminopicolinsäure, Ala = Alanin),
- am Anfang steht das N-terminale Ende, wobei H- für die freie und R- für die geschützte Aminosäure steht,
- am Ende steht das C-terminale Ende, wobei -OH oder -OR die freie bzw. die mit der Schutzgruppe R geschützte Aminosäure indizieren,
- als Stereodeskriptoren werden *R* und *S* verwendet
- Abkürzungen für Substituenten an Prolinderivate werden innerhalb von runden Klammern zusammengefasst,
- Alle Substituenten an Prolinderivaten befinden sich in 4-Position.

Als Abkürzungen für die verschiedenen Prolinderivate werden, wenn nicht in der Bezeichnung anders angegeben, folgende verwendet:



Die in den NMR-Spektren verwendeten Zuordnungen beziehen sich auf die Angaben in der folgenden Abbildung.



Weitere hier nicht gekennzeichnete Protonen und Kohlenstoffatome sind in der Spektreninterpretation eindeutig gekennzeichnet.

Bei Produkten, die sich nur durch den Ester an der Aminopicolinsäureeinheit unterschieden, wird exemplarisch die Synthese des Methylesters angegeben. Die Darstellung des Allylesters erfolgte analog.

*Lösungsmittel und Inertgas:* Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Bedarf nach Standardmethoden gereinigt und getrocknet. THF, Methanol und DMF wurden, falls nötig, durch Einleiten von trockenem Stickstoff entgast. Bei den Synthesen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurde Reinstickstoff (99.95%) als Inertgas verwendet.

Die zur Entschützung notwendige 6 N HCl in 1,4-Dioxan Lösung wurde durch Einleiten von Chlorwasserstoff in trockenes 1,4-Dioxan unter Eiskühlung hergestellt. Es wurde so lange Gas eingeleitet bis die Lösung eine Konzentration von mindestens 6 N hatte. Auf die gleiche Weise wurden 14 N HCl sowie 8 N NH<sub>3</sub> in trockenem Methanol hergestellt. Die jeweiligen Konzentrationen wurden durch Titrationen mit 1 N NaOH bzw. HCl überprüft.

### 6.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### *Spaltung von Allylestergruppen*

Der Allylester wurde in einem Schlenkkolben dreimal sekuriert und in entgastem THF p.a. (20 ml/mmol) gelöst. Im Stickstoffgegenstrom wurde eine Spatelspitze des Katalysators Tetrakis[triphenylphosphin]palladium(0) gefolgt von 3 equiv Morpholin zugegeben. Nach etwa 5 Minuten wurde die Umsetzung mittels Dünnschichtchromatographie untersucht und falls noch Edukt vorhanden war etwas Katalysator nachdosiert. Anschließend wurde noch eine halbe Stunde gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (im Falle der Hexapeptide wurde Dichlormethan verwendet) aufgenommen. Diese Lösung wurde dreimal mit 3 %iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt, der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend direkt weiter umgesetzt.

*Spaltung von Boc-Gruppen*

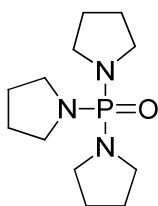
Das Boc-geschützte Edukt wurde in trockenem 1,4-Dioxan (20 ml) suspendiert. Die Suspension wurde in einem Eisbad abgekühlt und tropfenweise mit einer 6 N Lösung von HCl in trockenem 1,4-Dioxan (40 ml) versetzt. Anschließend wurde noch 2 h in der Kälte gerührt, die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer i.Vak. zur Trockne eingengt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

*Spaltung von Z-Gruppen*

Zu 1 mmol Z-geschütztem Peptid in Dichlormethan/Methanol 1:1 (v/v) (40 ml) wurden 50 mg Pd/C (10 %) gegeben. Um bei der Reaktion Nebenreaktionen der entstehenden freien Aminogruppen zu vermeiden, wurden 1.2 equiv HCl in Form von 1 N Salzsäure pro Aminogruppe hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck über mehrere Tage gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, mit ausreichend Methanol nachgewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer i.Vak. zur Trockne eingengt. Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum wurde der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

*Spaltung von Estergruppen durch Verseifung*

Der zu entschützende Ester wurde in 1,4-Dioxan (20 ml/mmol) gelöst und mit 1.2 equiv 1 N Natronlauge versetzt. Die Lösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt (eventuell muss noch etwas Natronlauge nachdosiert werden). Dann wurde Wasser zugegeben und das 1,4-Dioxan am Rotationsverdampfer entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wurde zweimal mit Diethylether gewaschen, mit 3 %iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 2 angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Er wurde ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt.

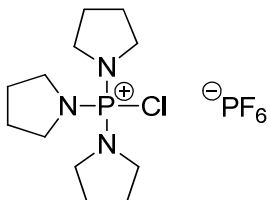
**6.4.3 Tripyrrolidinphosphinoxid<sup>[147]</sup>**

Eine Lösung von Pyrrolidin (42.6 g, 0.60 mol) und Triethylamin (60.6 g, 0.60 mol) in trockenem Toluol (200 ml) wurde in einem Eis/Kochsalzbad auf ca. 0 °C abgekühlt. Unter kräftigem Rühren mit einem KPG-Rührer wurde eine Lösung von Phosphorylchlorid (30.7 g, 0.20 mol) in trockenem Toluol (200 ml) so zugetropft, dass die Temperatur der Reaktionsmischung 5 °C nicht übersteigt. Es wurde noch 2 h in der Kälte gerührt und anschließend 5 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wurde das ausgefallene Triethylammoniumhydrochlorid in einer Glasfritte durch eine ca. 3 cm dicke Schicht Kieselgel abfiltriert. Das Salz wurde mit Ethylacetat (ca. 400 ml) gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden i.Vak. am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum über eine kurze Vigreuxkolonne destilliert. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine CHN-Analyse durchgeführt.

Ausbeute: 28.4 g (0.11 mol, 55 % d. Th.) farbloses Öl

Siedepunkt: 114 – 118 °C (0.04 mbar) [131 – 133 °C (1 Torr)]<sup>[148]</sup>

Brechungsindex:  $n_D^{25} = 1.5110$  [ $n_D^{20} = 1.514$ ]<sup>[149]</sup>

**6.4.4 PyCloP<sup>[150]</sup>**

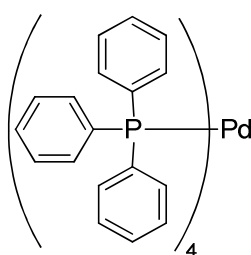
Zu einer Lösung von frisch destilliertem Phosphorylchlorid (4.6 ml, 50 mmol) in Dichlormethan (7 ml) wurde bei Raumtemperatur tropfenweise eine Lösung von Tripyrrolidinphosphinoxid (12.9 g, 50 mmol, 1 equiv) in Dichlormethan (7 ml) gegeben und

noch 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung unter kräftigem Rühren in eine Lösung von Kaliumhexafluorophosphat (9.2 g, 50 mmol, 1 equiv) in Wasser (70 ml) eingegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige noch dreimal mit Dichlormethan (je 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde aus Ethylacetat umkristallisiert. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine Elementaranalyse angefertigt.

Ausbeute: 16.4 g (78 % d. Th.) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 146 – 148 °C [150 – 151 °C]<sup>[150]</sup>

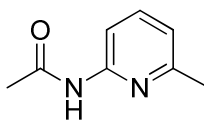
#### 6.4.5 Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)<sup>[151]</sup>



Palladiumchlorid (220 mg, 1.24 mmol) sowie Triphenylphosphin (1.63 g, 6.2 mmol, 5 equiv) wurden in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Stickstoffatmosphäre mit entgastem DMSO (15 ml) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 150 °C erhitzt, wobei sich die Feststoffe lösten. Nach Entfernen des Ölbad und kurzem Abkühlen der Lösung wurde Hydrazinhydrat (241 µl, 4.96 mmol, 4 equiv) zugetropft, wobei eine heftige Reaktion einsetzte und das Produkt bei Abkühlen der Lösung ausfiel. Der gelbe Feststoff wurde unter Stickstoff abfiltriert, zweimal mit entgastem Ethanol gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Er wurde unter Stickstoff und Lichtausschluss im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine CHN-Analyse durchgeführt.

Ausbeute: 0.29 g (88 % d. Th.) hellgelber Feststoff

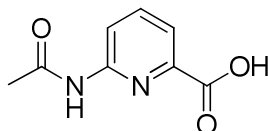
Schmelzpunkt: 103 – 107 °C [110 – 115 °C]<sup>[152]</sup>

**6.4.6 *N*-Acetyl-2-amino-6-picolin 6<sup>[153]</sup>****6**

6-Amino-2-picolin (24.9 g, 0.23 mol) wurde in Chloroform (115 ml) gelöst. Es wurde Acetanhydrid (32.6 ml, 0.34 mol, 1.5 equiv) zugegeben und die Reaktionsmischung 30 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die organische Phase zweimal mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer i.Vak. eingengt und der Rückstand aus Petrolether 60/80 umkristallisiert. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine CHN-Analyse durchgeführt.

Ausbeute: 30.4 g (88 % d. Th.) farblose Kristalle

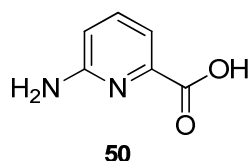
Schmelzpunkt: 87 – 89 °C [ 86 – 88 °C]<sup>[154]</sup>

**6.4.7 *N*-Acetyl-6-aminopicolinsäure 7<sup>[40]</sup>****7**

*N*-Acetyl-6-amino-2-picolin (30.4 g, 0.20 mol) wurde in destilliertem Wasser (250 ml) suspendiert. Die Suspension wurde auf 75 °C erhitzt, wobei das Edukt in Lösung ging. Nun wurde vorsichtig innerhalb von 40 min festes Kaliumpermanganat (80.0 g, 0.51 mol, 2.5 equiv) portionsweise so zugegeben, dass die Temperatur der Reaktionsmischung 80 °C nicht überstieg. Nach 3 h Rühren bei 75 °C wurde die noch heiße Reaktionslösung über Celite abfiltriert. Sie wurde in einem Eisbad abgekühlt und mit HCl auf einen pH von 4 – 5 angesäuert, wobei das Produkt ausfiel. Nach dem Abfiltrieren wurde es mit wenig Eiswasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine CHN-Analyse durchgeführt.

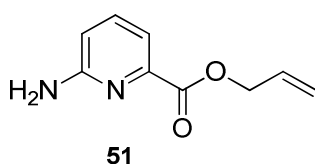
Ausbeute: 14.2 g (39 % d. Th.) farbloser Feststoff



**6.4.8 6-Aminopicolinsäure 50<sup>[155]</sup>**

*N*-Acetyl-6-aminopicolinsäure **7** (14.2 g, 79.0 mmol) wurde in 10 %iger wässriger Natronlauge (150 ml) gelöst. Die Lösung wurde 6 h lang zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen unter Eiskühlung mit HCl konz. auf einen pH von 4 – 5 angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, nacheinander mit wenig Eiswasser, Aceton und Diethylether gewaschen und zuletzt i.Vak. über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt konnte ohne weitere Reinigungsschritte für die nächste Stufe eingesetzt werden.

Ausbeute: 10.8 g (99 % d. Th.) farbloser Feststoff

**6.4.9 6-Aminopicolinsäureallylester 51<sup>[56]</sup>**

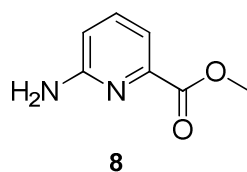
6-Aminopicolinsäure (6.90 g, 50.0 mmol) und NaHCO<sub>3</sub> (8.40 g, 100 mmol, 2 equiv) wurden in DMF p.a. (300 ml) suspendiert. Es wurde 3-Brom-1-propen (13.1 ml, 150 mmol, 3 equiv) zugegeben und die Suspension 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum einkondensiert und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit 10 %iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde sie am Rotationsverdampfer eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v) gereinigt. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine Elementaranalyse angefertigt.

Ausbeute: 4.90 g (55 % d. Th.) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 71 – 73 °C [72 – 73 °C]<sup>[56]</sup>

$^1\text{H-NMR}$ : [400 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 4.78 (s, 2H, NH), 4.89 (d,  $^3J$  = 5.7 Hz, 2H, All  $\text{CH}_2$ ), 5.31 (dd,  $^2J$  = 1.3 Hz,  $^3J_{\text{cis}}$  = 10.4 Hz, 1H, All  $\text{H}_{\text{cis}}$ ), 5.43 (dd,  $^2J$  = 1.3 Hz,  $^3J_{\text{trans}}$  = 17.2 Hz, 1H, All  $\text{H}_{\text{trans}}$ ), 6.07 (m, 1H, All  $\text{H}_{\text{vic}}$ ), 6.69 (dd,  $^3J$  = 8.2 Hz,  $^4J$  = 0.9 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.51 (dd,  $^3J$  = 7.3 Hz,  $^4J$  = 0.9 Hz, 1H, Apa H(5)), 7.56 (t,  $^3J$  = 8.2 Hz,  $^3J$  = 7.3 Hz, 1H, Apa H(4)) ppm

#### 6.4.10 6-Aminopicolinsäuremethylester **8**<sup>[40]</sup>

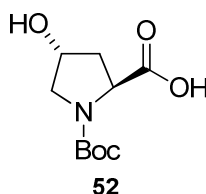


*N*-Acetyl-6-aminopicolinsäure (5.00 g, 27.8 mmol) wurde in 13 N methanolischer HCl-Lösung (200 ml) suspendiert und mit 2,2-Dimethoxypropan (4 ml, 32.5 mmol, 1.2 equiv) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Der pH-Wert wurde mit 10 %iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung auf etwa 9 eingestellt, das Methanol i.Vak. entfernt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt und das Rohprodukt aus Hexan/Ethylacetat umkristallisiert. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine Elementaranalyse angefertigt.

Ausbeute: 2.81 g (66 % d. Th.) hellgelber Feststoff

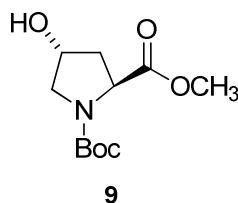
$^1\text{H-NMR}$ : [400 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 3.97 (s, 3H, OMe), 4.67 (br s, 2H, NH), 6.68 (dd,  $^3J$  = 8.0 Hz,  $^4J$  = 1.0 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.51 (dd,  $^3J$  = 7.3 Hz,  $^4J$  = 1.0 Hz, 1H, Apa H(5)), 7.56 (t,  $^3J$  = 7.9 Hz,  $^3J$  = 7.3 Hz, 1H, Apa H(4)) ppm

Schmelzpunkt: 82 – 85 °C [85 °C]<sup>[56]</sup>

**6.4.11 Boc-Hyp-OH 52<sup>[156]</sup>**

4*R*-Hydroxy-L-prolin (1.17 g, 8.95 mmol) wurde in 1,4-Dioxan/Wasser 2:1 (*v/v*) (30 ml) suspendiert, in einem Eisbad abgekühlt und mit Triethylamin (1.87 ml, 13.4 mmol, 1.5 equiv) versetzt. Anschließend wurde innerhalb von einer halben Stunde eine Lösung aus Di-*tert*-butyldicarbonat (2.15 g, 9.85 mmol, 1.1 equiv) in 1,4-Dioxan (20 ml) zugetropft. Es wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann das organische Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether gewaschen, der pH-Wert mit 3 %iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf etwa 2 angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend dreimal mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde auf eine exakte Charakterisierung verzichtet.

Ausbeute: 1.76 g (85 % d. Th.) farbloser Feststoff

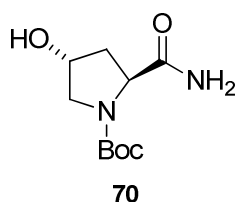
**6.4.12 Boc-Hyp-OMe 9<sup>[157]</sup>**

4*R*-Hydroxy-L-prolinmethylesterhydrochlorid (5.00 g, 27.6 mmol) wurde in 1,4-Dioxan/Wasser 2:1 (*v/v*) (75 ml) suspendiert und unter Eisbadkühlung mit Di-*tert*-butyldicarbonat (6.63 g, 30.4 mmol, 1.1 equiv) und Triethylamin (5.77 ml, 41.4 mmol, 1.5 equiv) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach das 1,4-Dioxan i.Vak. entfernt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat (150 ml) versetzt. Die organische Phase wurde mit Wasser (25 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend zweimal mit Ethylacetat (je 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 0.5 N HCl, Wasser,

5 %iger Natriumcarbonatlösung, Wasser und gesättigter Kochsalzlösung (je 12 ml) gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde auf eine exakte Charakterisierung verzichtet.

Ausbeute: 6.63 g (98 % d. Th.) farbloser Feststoff

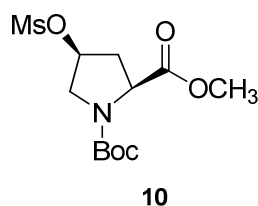
#### 6.4.13 Boc-Hyp-NH<sub>2</sub> 70<sup>[140]</sup>



Boc-Hyp-OMe (1.45 g, 5.91 mmol) wurde bei -20 °C in einer 7 N methanolischen Ammoniaklösung gelöst und 14 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand mit Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) säulenchromatographisch aufgereinigt, um nicht umgesetztes Edukt abzutrennen. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine Elementaranalyse angefertigt.

Ausbeute: 1.32 g (97 % d. Th.) farbloser Feststoff

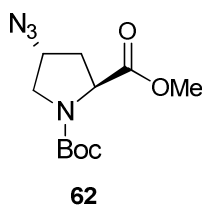
<sup>1</sup>H-NMR: [600 MHz, 100 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ = 1.40 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 1.90 – 1.94 (m, 1H, Hyp H(β)), 2.03 – 2.04 (m<sub>c</sub>, 1H, Hyp H(β)), 3.27 (d, <sup>3</sup>J = 10.9 Hz, 1H, Hyp H(δ)), 3.43 (dd, <sup>3</sup>J = 10.9 Hz, <sup>4</sup>J = 4.8 Hz, 1H, Hyp H(δ)), 4.15 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H, Hyp H(α)), 4.26 (m<sub>c</sub>, 1H, Hyp H(γ)), 4.60 (br s, 1H, OH), 6.68 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>) ppm

**6.4.14 Boc-4S-(Ms)Hyp-OMe 10<sup>[43]</sup>**

Triphenylphosphin (8.09 g, 30.9 mmol, 2 equiv) wurde in einem Schlenkkolben unter Schutzgas in trockenem Toluol (17 ml) gelöst und mit frisch destillierter Methansulfonsäure (1.33 ml, 20.6 mmol, 1.5 equiv) versetzt. Unter Eiskühlung wurden nacheinander Triethylamin (0.96 ml, 6.9 mmol, 0.5 equiv), eine Lösung von **9** (3.75 g, 15.3 mmol) in trockenem Toluol (20 ml) und DIAD (6.1 ml, 30.9 mmol, 2 equiv) zugegeben. Anschließend wurde für 4 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 1:1 (v/v) gereinigt. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine CHN-Analyse durchgeführt.

Ausbeute: 3.34 g (67 % d. Th.) farbloses Öl

<sup>1</sup>H-NMR: [400 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>] δ = 1.44 + 1.49 (2s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 2.52 – 2.57 (m, 2H, Hyp H(β)), 3.03 (s, 3H, MsCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (m, 2H, Hyp H(δ)), 4.40 – 4.54 (m, 1H, Hyp H(γ)), 5.24 (m, 1H, Hyp H(α)) ppm

**6.4.15 Boc-(Azido)Pro-OMe 62<sup>[158]</sup>**

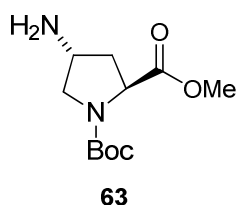
Verbindung **10** (168 mg, 519 μmol) wurde in DMF p.a. (10 ml) gelöst. Es wurde Natriumazid (168 mg, 2.59 mmol, 5 equiv) zugegeben und drei Stunden bei 80 °C gerührt. Anschließend

wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser, 10 %iger Natriumcarbonat-Lösung und schließlich mit gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 1:1 (v/v) aufgereinigt. Da es sich bei dieser Verbindung um eine literaturbekannte Substanz handelt, wurde keine Elementaranalyse angefertigt.

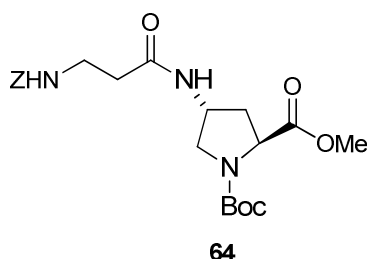
Ausbeute: 1.31 g (96 % d. Th.) farbloses Öl

$^1\text{H}$ -NMR: [400 MHz, 100 °C,  $\text{DMSO}-d_6$ ]  $\delta$  = 1.37 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.16 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 2.32 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 3.42 (ddd,  $^3J$  = 11.6 Hz,  $^4J$  = 3.1 Hz,  $^4J$  = 1.3 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.56 (dd,  $^3J$  = 11.5 Hz,  $^4J$  = 5.3 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.66 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.28 (m, 2H, Pro H( $\alpha$ ) + Pro H( $\gamma$ )) ppm

#### 6.4.16 Boc-Apro-OMe **63**<sup>[158]</sup>



Verbindung **62** (135 mg, 498  $\mu\text{mol}$ ) wurde in Dichlormethan/Methanol (10 ml) gelöst. Anschließend wurde 10% Pd/C (15 mg) zugegeben und 18 h bei Normaldruck unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, gründlich mit Methanol nachgewaschen, und das Filtrat i.Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat gewaschen. Daraufhin wurde sie mit 10 %iger Natriumcarbonat-Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend i.Vak. entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

**6.4.17 Boc-(Z-β-Ala)Apro-OMe 64**

Boc-Apro-OMe **79** (498  $\mu\text{mol}$ ) wurde in trockenem Dichlormethan (20 ml) suspendiert und mit Z-β-Ala-OH (122 g, 548  $\mu\text{mol}$ , 1.1 equiv), TBTU (192 mg, 599  $\mu\text{mol}$ , 1.2 equiv) und DIEA (210  $\mu\text{l}$ , 1.20 mmol, 2.4 equiv) versetzt. Die anfänglich farblose Reaktion verfärbte sich nach ca. 20 min gelb. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) als Eluens isoliert. Da dieses Produkt lediglich für einen Testansatz verwendet und daher nur im geringen Maßstab hergestellt wurde, wurde auf eine vollständige Charakterisierung verzichtet.

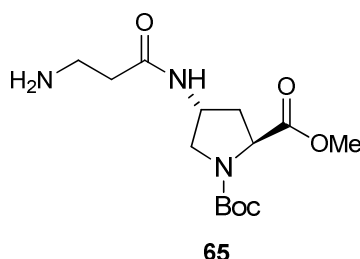
Ausbeute: 148 mg (66 % d. Th.) farbloser Schaum

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 350.1  $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$  (37), 472.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), 488.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (42)

$^1\text{H-NMR}$ : [400 MHz, 100  $^\circ\text{C}$ , DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.39 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.03 – 2.17 (m, 2H, Apro H( $\beta$ )), 2.29 (t,  $^3J = 7.0$ , 2H, Ala ( $-\text{CH}_2\text{-CO-}$ )), 3.18 – 3.28 (m, 3H, Apro H( $\delta$ ) + Ala ( $-\text{NH-CH}_2\text{-}$ )), 3.57 (m, 1H, Apro H( $\delta$ )), 3.67 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.26 – 4.33 (m, 2H, Apro H( $\alpha$ ) + Apro H( $\gamma$ )), 5.04 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Z})$ ), 6.76 (s, 1H, Ala  $-\text{NH-}$ ), 7.30 – 7.38 (m, 5H, Ph), 7.82 (s, 1H, Apro  $-\text{NH-}$ ) ppm

IR: [KBr] 3305 (m), 2964 (m), 1691 (s), 1535 (s), 1453 (m), 1401 (s), 1367 (w), 1258 (s), 1156 (s), 1066 (m), 1013 (s), 769 (s)  $\text{cm}^{-1}$

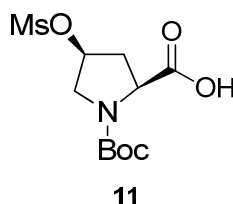
CHN-Analyse: ber C: 58.78 % H: 6.95 % N: 9.35 %  
 gef C: 58.80 % H: 6.78 % N: 9.38 %  $M_w$ : 449.22  
 $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$

**6.4.18 Boc-( $\beta$ -Ala)Apro-OMe 65**

Boc-(Z- $\beta$ -Ala)Apro-OMe **64** (148 mg, 330  $\mu$ mol) wurde in Dichlormethan/Methanol (50 ml) gelöst. Anschließend wurde 10% Pd/C (20 mg) zugegeben und 18 h bei Normaldruck unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, sorgfältig mit Methanol nachgewaschen, und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Da dieses Produkt lediglich für einen Testansatz verwendet und daher nur im geringen Maßstab hergestellt wurde, wurde auf eine vollständige Charakterisierung verzichtet.

Ausbeute: 103 mg (99 % d. Th.) farbloser Schaum

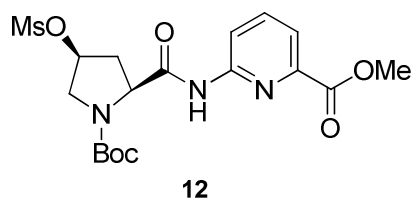
$^1\text{H-NMR}$ : [400 MHz, 100  $^{\circ}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.40 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.13 – 2.15 (m, 1H, Apro H( $\beta$ )), 2.19 – 2.23 (m, 1H, Apro H( $\beta$ )), 2.51 – 2.54 (m, 2H, Ala ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ )), 3.04 (t,  $^3J$  = 6.7, 2H, Ala ( $\text{-CH}_2\text{-CO-}$ )), 3.22 – 3.27 (m, 1H, Apro H( $\delta$ )), 3.60 – 3.63 (m, 1H, Apro H( $\delta$ )), 3.68 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.34 (m<sub>c</sub>, 2H, Apro H( $\alpha$ ) + Apro H( $\gamma$ )), 7.80 (s, 1H, Ala ( $\text{-NH-}$ )), 8.06 (s, 1H, Apro ( $\text{-NH-}$ )) ppm

**6.4.19 Boc-4S-(Ms)Hyp-OH 11<sup>[43]</sup>**

Boc-4S-(Ms)Hyp-OMe **10** (3.24 g, 10.6 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Estergruppen durch Verseifung* entschützt und direkt im Anschluss weiter umgesetzt.

Ausbeute: 3.25 g (99 % d.Th.) farbloser Schaum



**6.4.20 Boc-4S-(Ms)Hyp-Apa-OMe 12**

Boc-4S-(Ms)Hyp-OH **11** (1.49 g, 4.81 mmol, 1 equiv), 6-Aminopicolinsäuremethylester **8** (732 mg, 4.81 mmol, 1 equiv) sowie PyCloP (2.43 g, 5.77 mmol, 1.2 equiv) wurden in trockenem Dichlormethan (70 ml) gelöst, mit DIEA (2.00 ml, 11.5 mmol, 2.4 equiv) tropfenweise versetzt und 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 2:1 (v/v) als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 1.88 g (88 % d.Th.) farbloser Schaum

Schmelzpunkt : 69 – 75 °C

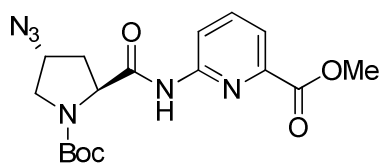
Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 444.1  $[M+H]^+$  (92), 466.1  $[M+Na]^+$  (100), 482.1  $[M+K]^+$  (15)

$^1\text{H-NMR}$ : [600 MHz, 100 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.39 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.29 (m, 1H, Hyp H( $\beta$ )), 2.75 (m, 1H, Hyp H( $\beta$ )), 3.14 (s, 3H,  $\text{CH}_3(\text{Ms})$ ), 3.60 (dd,  $^2J$  = 17.9 Hz,  $^3J$  = 5.1 Hz, 1H, Hyp H( $\delta$ )), 3.87 (m, 1H, Hyp H( $\delta$ )), 3.90 (s, 3H,  $\text{CH}_3(\text{Ester})$ ), 4.57 (m, 1H, Hyp H( $\alpha$ )), 5.24 (m, 1H, Hyp H( $\gamma$ )), 7.76 (d,  $^3J$  = 11.2 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.97 (t,  $^3J$  = 11.9 Hz, 1H, Apa H(4)), 8.25 (d,  $^3J$  = 12.5 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.37 (s, 1H, NH) ppm

IR: [KBr] 3402 (w), 2979 (w), 2936 (w), 1702 (s), 1580 (m), 1533 (m), 1459 (m), 1402 (m), 1366 (m), 1305 (m), 1250 (m), 1169 (s), 960 (w), 904 (m), 769 (m), 527 (w)  $\text{cm}^{-1}$

Drehwert:  $[\alpha]_D^{22} = -32.7$  (c = 1, EtOAc)

CHN-Analyse:	ber	C: 48.75 %	H: 5.68 %	N: 9.48 %	S: 7.23 %
	gef	C: 48.49 %	H: 5.71 %	N: 9.27%	S: 7.01 %
		$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$	$M_w$ : 443.47		

**6.4.21 Boc-(Azido)Pro-Apa-OMe 13****13**

Boc-4*S*-(Ms)Hyp-Apa-OMe **12** (1.88 g, 4.23 mmol) und Natriumazid (1.37 g, 21.2 mmol, 5 equiv) wurden in DMF p.a. (90 ml) gelöst und die Lösung für 4 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde einkondensiert, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.Vak. wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 2:1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1.42 g (86 % d.Th.) farbloser Schaum

Schmelzpunkt: 111 – 115 °C

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 391.1  $[M+H]^+$  (100), 413.1  $[M+Na]^+$  (38), 429.1  $[M+K]^+$  (7)

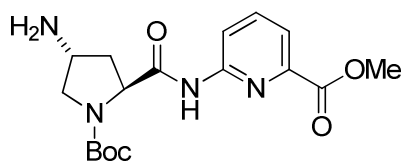
$^1\text{H-NMR}$ : [600 MHz, 100 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.38 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.25 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 2.40 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 3.50 (d,  $^2J$  = 11.6 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.66 (dd,  $^2J$  = 11.6 Hz,  $^3J$  = 5.2 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.92 (s, 3H, OMe), 4.33 (m, 1H, Pro H( $\gamma$ )), 4.62 (m, 1H, Pro H( $\alpha$ )), 7.75 (d,  $^3J$  = 7.6 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.95 (t,  $^3J$  = 8.0 Hz, 1H, Apa H(4)), 8.25 (2 d,  $^3J$  = 8.3 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.46 (d, 1H, NH) ppm

IR: [KBr] 3241 (w), 3122 (w), 3075 (w) 2969 (w), 2891 (w), 2107 (m), 1726 (s), 1712 (s), 1677 (s), 1578 (m), 1541 (m), 1460 (s), 1420 (s), 1402 (m), 1368 (m), 1325 (m), 1306 (s), 1253 (m), 1188 (m), 1155 (s), 1133 (m), 982 (w), 775 (m)  $\text{cm}^{-1}$

Drehwert:  $[\alpha]_D^{22} = -26.0$  ( $c$  = 1, EtOAc)

CHN-Analyse: ber C: 52.35 % H: 5.76 % N: 21.05 %  
 gef C: 52.19 % H: 5.51 % N: 20.81 %  $M_w$ : 390.39  
 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_5 \cdot 0.1 \text{ EtOAc}$

## 6.4.22 Boc-Apro-Apa-OMe 21



21

Boc-(Azido)Pro-Apa-OMe **13** (1.42 g, 3.65 mmol) wurde zusammen mit Triphenylphosphin (1.91 g, 7.30 mmol, 2 equiv) in THF (30 ml) gelöst. Nach Zugabe von destilliertem Wasser (131  $\mu$ l, 7.30 mmol, 2 equiv) wurde die Lösung für 4 h zum Sieden erhitzt, das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1.17 g (88 % d.Th.) farbloser Schaum

Schmelzpunkt: 74 – 89 °C

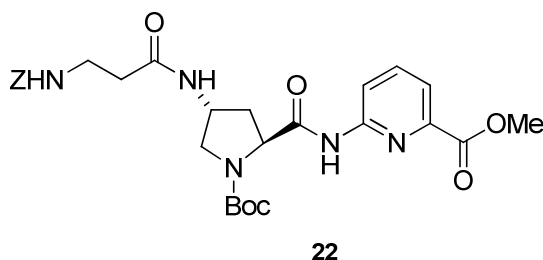
Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 365.1  $[M+H]^+$  (50), 387.1  $[M+Na]^+$  (100), 403.1  $[M+K]^+$  (22)

$^1\text{H-NMR}$ : [600 MHz, 100 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.37 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.00 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 2.08 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 3.08 (m, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.56 (m, 2H, Pro H( $\delta$ ) + Pro H( $\gamma$ )), 3.90 (s, 3H, OMe), 4.57 (m, 1H, Pro H( $\alpha$ )), 7.73 (d,  $^3J$  = 7.5 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.93 (t,  $^3J$  = 8.0 Hz 1H, Apa H(4)), 8.24 (2 d,  $^3J$  = 8.3 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.20 (br s, 1H, NH) ppm

IR: [KBr] 3358 (m), 3345 (m), 2978 (m), 1701 (s), 1579 (m), 1541 (m), 1456 (m) 1405 (s), 1368 (m), 1304 (m), 1251 (m), 1162 (s), 1082 (w), 990 (w), 769 (m)  $\text{cm}^{-1}$

Drehwert:  $[\alpha]_D^{22} = -25.7$  (c = 1, Methanol)

CHN-Analyse: ber C: 53.39 % H: 6.85 % N: 14.65 %  
 gef C: 53.81 % H: 6.99 % N: 14.69 %  $M_w$ : 364.40  
 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$

**6.4.23 Boc-(Z-β-Ala)Apro-Apa-OMe 22**

Boc-Apro-Apa-OMe **21** (1.17 g, 3.21 mmol) sowie Z-β-Ala-OH (788 mg, 3.53 mmol, 1.1 equiv) wurden in trockenem Dichlormethan (50 ml) gelöst. Es wurde TBTU (1.24 g, 3.85 mmol, 1.2 equiv) sowie DIEA (1.34 ml, 7.70 mmol, 2.4 equiv) zugegeben und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde Ethylacetat zugegeben und dann zunächst mit 10 %iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, dann mit Wasser und schließlich mit gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit Chloroform/Aceton 1:1 (v/v) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.63 g (89 % d.Th.) farbloser Schaum

Schmelzpunkt: 75 – 87 °C

Massenspektrum: MALDI/TOF (*m/z*): 470.2 [M–Boc+H]<sup>+</sup> (82), 492.2 [M–Boc+Na]<sup>+</sup> (19), 508.2 [M–Boc+K]<sup>+</sup> (4), 570.3 [M+H]<sup>+</sup> (30), 592.3 [M+Na]<sup>+</sup> (100), 608.3 [M+K]<sup>+</sup> (37)

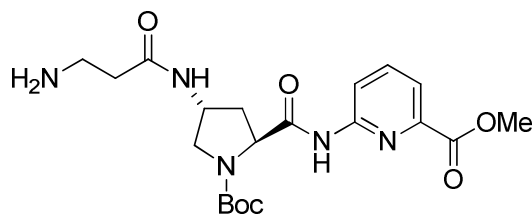
<sup>1</sup>H-NMR: [600 MHz, 100 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ = 1.37 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 2.18 (m<sub>c</sub>, 2H, Pro H(β)), 2.32 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 3.22 (m, 1H, Pro H(δ)), 3.28 (q, <sup>3</sup>*J* = 6.4 Hz, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-), 3.71 (dd, <sup>2</sup>*J* = 10.6 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 1H, Pro H(δ)), 3.89 (s, 3H, OMe), 4.35 (q, <sup>3</sup>*J* = 6.5 Hz, 1H, Pro H(γ)), 4.59 (m<sub>c</sub>, 1H, Pro H(α)), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Z)), 6.56 (br s, 1H, NHZ), 7.32 (m<sub>c</sub>, 5H, Ph), 7.62 (br s, 1H, Apro NH), 7.73 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.94 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 1H, Apa H(4)), 8.23 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.28 (br s, 1H, Apa NH) ppm

IR: [KBr] 3329 (m), 3067 (w), 2977 (w), 1702 (s), 1578 (m), 1542 (m), 1458 (m), 1438 (m), 1405 (m), 1368 (m), 1306 (m), 1250 (m), 1160 (m), 1066 (w), 991 (w), 770 (m), 699 (w) cm<sup>-1</sup>

Drehwert:  $[\alpha]_D^{22} = -30.5$  ( $c = 1$ , EtOAc)

CHN-Analyse: ber C: 59.04 % H: 6.19 % N: 12.30 %  
 gef C: 59.22 % H: 6.47 % N: 11.79 %  $M_w$ : 569.61  
 $C_{28}H_{35}N_5O_8$

#### 6.4.24 Boc-( $\beta$ -Ala)Apro-Apa-OMe **62**

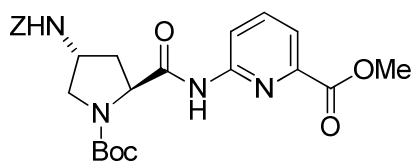


**62**

Boc-(Z- $\beta$ -Ala)Apro-Apa-OMe **22** (102 mg, 179  $\mu$ mol) wurde in einem 1:1 Gemisch aus Dichlormethan/Methanol 1:1 (v/v) (15 ml) gelöst, mit 10 % Pd/C (10 mg) versetzt und für 36 h in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde nach Beendigung der Reaktion über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und das Produkt i.Vak. getrocknet. Da diese Substanz lediglich für einen Testansatz verwendet und daher nur im geringen Maßstab hergestellt wurde, wurde keine vollständige Charakterisierung durchgeführt.

Ausbeute: 77.3 mg (99 % d.Th.) farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ : [600 MHz, 100 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.38 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.21 – 2.24 (m, 2H, Pro H( $\beta$ )), 2.55 – 2.59 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CO-}$ ), 3.05 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H,  $-\text{NH-CH}_2\text{-}$ ), 3.25 – 3.28 (m, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.74 (dd,  $^2J = 10.7$  Hz,  $^3J = 7.1$  Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.90 (s, 3H, OMe), 4.39 (m, 1H, Pro H( $\gamma$ )), 4.61 – 4.63 (m, 1H, Pro H( $\alpha$ )), 7.74 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, Apa H(3)), 7.94 (t,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H, Apa H(4)), 8.11 (br s, 2H, Ala  $\text{NH}_2$ ), 8.23 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H, Apa H(5)), 10.31 (br s, 1H, Apa NH) ppm

**6.4.25 Boc-(Z)Apro-Apa-OMe 29****29**

Boc-Apro-Apa-OMe **21** (1.17 g, 3.21 mmol) wurde in trockenem Dichlormethan (70 ml) gelöst. Es wurde DIEA (840  $\mu$ l, 4.82 mmol, 1.5 equiv) zugegeben und anschließend unter Eiskühlung tropfenweise Benzylchloroformiat (916  $\mu$ l, 6.42 mmol, 2 equiv) zugegeben. Die Lösung wurde nach vollständiger Zugabe für 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 3:1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1.53 g (96 % d.Th.) farbloser Schaum

Schmelzpunkt : 72 – 79 °C

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 399.1  $[M-Boc+H]^+$  (9), 499.3  $[M+H]^+$  (36), 521.3  $[M+Na]^+$  (100), 537.3  $[M+K]^+$  (72)

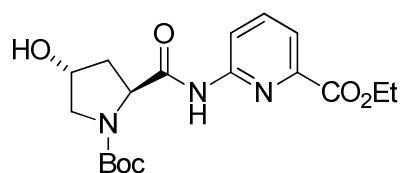
$^1H$ -NMR: [400 MHz, 100 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.36 (s, 9H,  $^t$ Bu), 2.20 (m, 2H, Pro H( $\beta$ )), 3.25 (dd,  $^2J$  = 10.5 Hz,  $^3J$  = 5.8 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.71 (dd,  $^2J$  = 10.3 Hz,  $^3J$  = 6.9 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.90 (s, 3H, OMe), 4.21 (m, 1H, Pro H( $\gamma$ )), 4.57 (dd,  $^3J_{trans}$  = 8.8 Hz,  $^3J_{cis}$  = 4.5 Hz, 1H, Pro H( $\alpha$ )), 5.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Z)), 7.19 (d,  $^3J$  = 6.0 Hz, 1H, NH(Z)), 7.34 (m, 5H, PhH), 7.75 (d,  $^3J$  = 7.1 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.96 (t,  $^3J$  = 7.9 Hz, 1H, Apa H(4)), 8.25 (d,  $^3J$  = 8.3 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.50 (s, 1H, NH) ppm

IR: [KBr] 3320 (m), 3065 (w), 3036 (w), 2978 (m), 1699 (s), 1580 (m), 1534 (s), 1457 (s), 1437 (m), 1404 (s), 1368 (w), 1307 (s), 1251 (s), 1161 (s), 1082 (m), 1026 (w), 990 (w), 770 (m), 698 (w)  $cm^{-1}$

Drehwert:  $[\alpha]_D^{22} = -13.3$  (c= 1, EtOAc)

CHN-Analyse:	ber	C: 60.23 %	H: 6.07 %	N: 11.24 %	
	gef	C: 60.25 %	H: 6.14 %	N: 11.05 %	M <sub>w</sub> : 498.53
		C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>			

#### 6.4.26 Boc-Hyp-Apa-OEt 72



72

Boc-*trans*-4-Hydroxy-L-prolin **52** (561 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv), 6-Aminopicolinsäureethylester (332 mg, 2.00 mmol, 1 equiv) und PyCloP (1.26 g, 3.00 mmol, 1.5 equiv) wurden in trockenem Dichlormethan (30 ml) gelöst. Anschließend wurde Diisopropylethylamin (1.05 ml, 6.00 mmol, 3 equiv) langsam zugetropft und die Reaktionslösung sechs Tage bei Raumtemperatur gerührt. Da zu diesem Zeitpunkt in der DC noch Edukt nachweisbar war, wurde weiteres PyCloP (0.42 g, 1.00 mmol, 0.5 equiv) nachdosiert und zwei zusätzliche Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel vollständig i.Vak. entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 19:1 (v/v) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 671 g (88 % d.Th.) farbloser Schaum

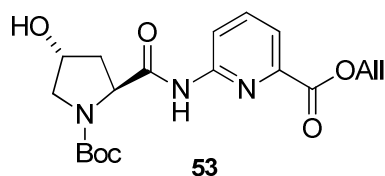
Schmelzpunkt : 70 – 74 °C

Massenspektrum: MALDI/TOF (*m/z*): 302.0 [M–Boc+Na]<sup>+</sup> (12), 380.2 [M+H]<sup>+</sup> (22), 402.2 [M+Na]<sup>+</sup> (100)

<sup>1</sup>H-NMR: [600 MHz, 100 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ = 1.36 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.6, 12H, Et(CH<sub>3</sub>) + <sup>t</sup>Bu), 2.05 – 1.99 (m, 1H, Pro H(β)), 2.19 (m<sub>c</sub>, 1H, H(β)), 3.34 (d, <sup>3</sup>*J* = 11.2, 1H, Pro H(δ)), 3.52 (dd, <sup>2</sup>*J* = 11.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.7 Hz, 1H, Pro H(δ)), 4.33 (m<sub>c</sub>, 1H, Pro H(γ)), 4.38 (q, <sup>3</sup>*J* = 7.1, 2H, Et(CH<sub>2</sub>)), 4.59 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.5, 1H, Pro H(α)), 4.74 (br s, 1H, OH), 7.75 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.95 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 1H, Apa H(4)), 8.27 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.48 (s, 1H, NH) ppm

$^{13}\text{C}$ -NMR:	[151 MHz, 25°C, DMSO- $d_6$ ] $\delta$ = 13.9 (CH <sub>3</sub> ), 27.8 (Boc(CH <sub>3</sub> )), 38.4 (Pro C( $\beta$ )), 54.7 (Pro C( $\delta$ )), 58.9 (Pro C( $\alpha$ )), 60.9 (Et(CH <sub>2</sub> )), 67.8 (Pro C( $\gamma$ )), 78.4 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 117.0 (Apa C(5)), 120.0 (Apa C(3)), 139.2 (Apa C(4)), 146.1 (Apa C(2)), 151.8 (Apa C(6)), 153.0 (COO <sup>t</sup> Bu), 164.2 (CO <sub>2</sub> Et), 172.7 (CO) ppm			
IR:	[KBr] 3341 (w), 2983 (m), 1732 (m), 1698 (s), 1595 (m), 1579 (m), 1523 (s), 1454 (s), 1419 (s), 1389 (s), 1366 (s), 1304 (s), 1246 (s), 1155 (s), 1080 (m), 948 (m), 831 (s), 768 (s) cm <sup>-1</sup>			
CHN-Analyse:	ber	C: 56.98 %	H: 6.64 %	N: 11.08 %
	gef	C: 56.82 %	H: 6.80 %	N: 11.05 %
		M <sub>w</sub> : 379.41		
		C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>		

#### 6.4.27 Boc-Hyp-Apa-OAll **53**<sup>[54]</sup>



Boc-*trans*-4-Hydroxy-L-prolin **52** (1.76 g, 7.61 mmol), 6-Aminopicolinsäureallylester **51** (1.56 g, 6.85 mmol, 0.9 equiv) und PyCloP (3.85 g, 9.31 mmol, 1.2 equiv) wurden in trockenem Dichlormethan (80 ml) gelöst. Bei Raumtemperatur wurde DIEA (3.18 ml, 18.3 mmol, 2.4 equiv) zugetropft und die Reaktionsmischung 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel vollständig i.Vak. entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 2:1 (v/v) als Eluens isoliert. Da diese Verbindung literaturbekannt ist, wurde keine CHN-Analyse angefertigt.

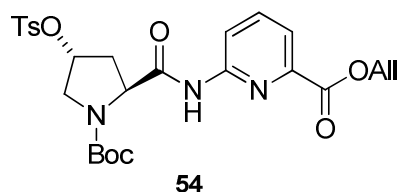
Ausbeute: 2.25 g (84 % d.Th.) farbloser Schaum

$^1\text{H}$ -NMR: [600 MHz, 100 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.27 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 1.97 – 2.03 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 2.15 – 2.19 (m, 1H, H( $\beta$ )), 3.31 (d, <sup>2</sup>*J* = 11.1 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 3.50 (dd, <sup>2</sup>*J* = 11.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.7 Hz, 1H, Pro H( $\delta$ )), 4.31 (m<sub>c</sub>, 1H, Pro H( $\gamma$ )), 4.57 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, Pro H( $\alpha$ )), 4.71 (br s, 1H, OH), 4.83 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>(All)), 5.29 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>cis</sub> = 9.2 Hz, 1H, AllH(cis)),



5.41 (d,  $^3J_{\text{trans}} = 17.2$  Hz, 1H, AllH(trans)), 6.01 – 6.08 (m, 1H, AllH(vic)), 7.75 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H, Apa H(3)), 7.95 (t,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H, Apa H(4)), 8.26 (2 d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H, Apa H(5)), 10.46 (s, 1H, NH) ppm

#### 6.4.28 Boc-(Ts)Hyp-Apa-OAll **54**<sup>[54]</sup>

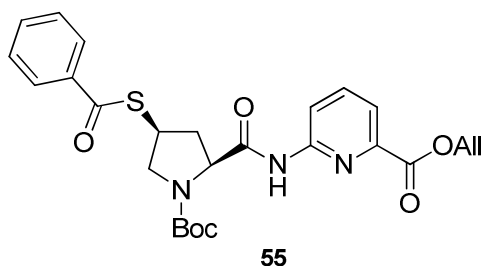


Boc-Hyp-Apa-OAll (2.25 g, 5.75 mmol) wurde in trockenem Dichlormethan (10 ml) gelöst und mit trockenem Pyridin (10 ml) versetzt. Danach wurde portionsweise *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (5.48 g, 28.7 mmol, 5 equiv) zugegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen und dann getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand chromatographisch mit Hexan/Ethylacetat 1:1 (v/v) gereinigt. Da diese Verbindung literaturbekannt ist, wurde keine CHN-Analyse angefertigt.

Ausbeute: 2.92 g (93 % d.Th.) farbloser Schaum

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 546.1  $[M+H]^+$  (18), 568.1  $[M+Na]^+$  (100), 584.1  $[M+K]^+$  (50)

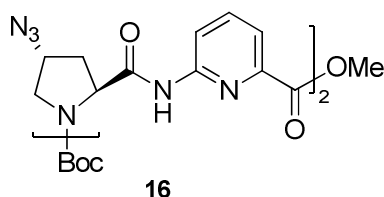
$^1\text{H-NMR}$ : [600 MHz, 100 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 1.37 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ), 2.19 – 2.23 (m, 1H, Hyp H( $\beta$ )), 2.29 (m, 4H, Hyp H( $\beta$ ) +  $\text{CH}_3$ ), 3.54 (d,  $^2J = 12.5$  Hz, 1H, Hyp H( $\delta$ )), 3.83 (dd,  $^2J = 12.5$  Hz,  $^3J = 4.3$  Hz, 1H, Hyp H( $\delta$ )), 4.61 ( $m_c$ , 1H, Hyp H( $\alpha$ )), 4.85 (d,  $^3J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2(\text{All})$ ), 5.16 ( $m_c$ , 1H, Hyp H( $\gamma$ )), 5.29 (d,  $^3J_{\text{cis}} = 10.4$  Hz, 1H, H(cis)), 5.42 (d,  $^3J_{\text{trans}} = 17.2$  Hz, 1H, H(trans)), 6.02 – 6.08 (m, 1H, H(vic)), 7.49 (d,  $^3J = 8.1$  Hz, 2H, Tos H(3)), 7.77 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1H, Apa H(3)), 7.80 (d,  $^3J = 8.2$  Hz, 2H, Tos H(2)), 7.96 (t,  $^3J = 7.9$  Hz, 1H, Apa H(4)), 8.24 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H, Apa H(5)), 10.61 (s, 1H, NH) ppm

**6.4.29 Boc-(Bz)Tpro-Apa-OAll 55<sup>[54]</sup>**

Boc-(Ts)Hyp-Apa-OAll (2.92 g, 5.35 mmol) und Kaliumcarbonat (2.22 g, 16.1 mmol, 3 equiv) wurden in DMF p.a. (120 ml) suspendiert. Nach Zugabe von Thiobenzoessäure 90 % (2.00 ml, 17.1 mmol, 3.2 equiv) wurde die Suspension fünf Stunden bei 80 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einer Kieselgelsäule (Pentan/Ethylacetat 2:1 (v/v)) gereinigt. Da diese Verbindung literaturbekannt ist, wurde keine CHN-Analyse angefertigt.

Ausbeute: 1.17 g (62 % d.Th.) gelber Schaum

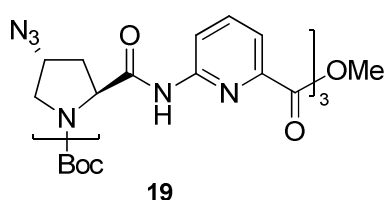
<sup>1</sup>H-NMR: [600 MHz, 100 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>]  $\delta$  = 1.37 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 2.05 – 2.07 (m, 1H, Tpro H( $\beta$ )), 2.88 – 2.92 (m, 1H, Tpro H( $\beta$ )), 3.39 (m<sub>c</sub>, 1H, Tpro H( $\gamma$ )), 3.94 – 3.97 (m, 1H, Tpro H( $\delta$ )), 4.12 – 4.18 (m, 1H, Tpro H( $\delta$ )), 4.62 (m<sub>c</sub>, 1H, Tpro H( $\alpha$ )), 4.84 (d, <sup>3</sup>*J* = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>(All)), 5.28 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>cis</sub> = 10.6 Hz, 1H, H(cis)), 5.42 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>trans</sub> = 17.2 Hz, 1H, H(trans)), 6.01 – 6.07 (m, 1H, H(vic)), 7.54 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, Bz H(3)), 7.66 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 1H, Bz H(4)), 7.73 (dd, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, <sup>4</sup>*J* = 0.6 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.88 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.2 Hz, 2H, Bz H(2)), 7.97 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 1H, Apa H(4)), 8.27 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.54 (br s, 1H, NH) ppm

6.4.30 Boc-[(Azido)Pro-Apa]<sub>2</sub>-OMe **16**

Boc-(Azido)Pro-Apa-OMe **13** (465 mg, 1.12 mmol) wurde am C-terminalen gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Estergruppen* entschützt. Eine äquivalente Menge von **13** wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am N-terminalen Ende entschützt. Die beiden so erhaltenen teilentschützten Dipeptide wurden in trockenem Dichlormethan (40 ml) gelöst und mit PyCloP (566 mg, 1.34 mmol, 1.2 equiv) und DIEA (780 µl, 4.48 mmol, 4 equiv) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde sie zur Trockne eingeeengt und der Rückstand chromatographisch mit Ethylacetat/Pentan 4:1 (v/v) als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 688 mg (91 % d. Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 649.4  $[M-N_2+H]^+$  (23), 675.4  $[M+H]^+$  (70), 697.4  $[M+Na]^+$  (100), 713.4  $[M+K]^+$  (97)

6.4.31 Boc-[(Azido)Pro-Apa]<sub>3</sub>-OMe **19**

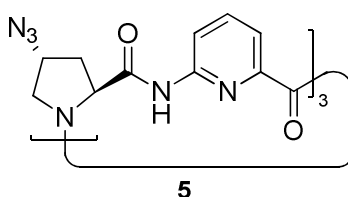
Boc-(Azido)Pro-Apa-OMe **13** (425 mg, 1.02 mmol) wurde am C-terminalen Ende gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Estergruppen* entschützt. Eine äquivalente Menge des Tetrapeptids Boc-[(Azido)Pro-Apa]<sub>2</sub>-OMe **16** (688 mg, 1.02 mmol, 1 equiv) wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am N-terminalen Ende entschützt. Die beiden so erhaltenen Peptide wurden in DMF p.a. (60 ml) gelöst, mit TBTU (393 mg, 1.22 mmol, 1.2 equiv) und DIEA (640 µl, 3.67 mmol, 3.6 equiv) versetzt und für 4 h

bei Raumtemperatur gelöst. Das Hexapeptid **19** wurde anschließend säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol 10:1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 895 g (94 % d. Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 907.5  $[M-N_2+H]^+$ , 933.5  $[M+H]^+$ , 955.5  $[M+Na]^+$ , 971.5  $[M+K]^+$  (100)

#### 6.4.32 *cyclo*[(Azido)Pro-Apa]<sub>3</sub> **5**



Das Hexapeptid **13** (895 mg, 0.96 mmol) wurde zunächst am C-terminalen Ende gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Estergruppen* entschützt. Anschließend wurde das Produkt gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am N-terminalen Ende entschützt. Zur Cyclisierung wurde TBTU (1.54 g, 4.80 mmol, 5 equiv) vorgelegt, unter Stickstoffatmosphäre zunächst entgastes DMF (200 ml) gefolgt von DIEA (0.40 ml, 2.30 mmol, 2.4 equiv) zugegeben und die Reaktionsmischung auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung des vollständig entschützten Hexapeptids sowie DIEA (1.00 ml, 5.76 mmol, 6 equiv) in entgastem DMF (40 ml) mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 4 h zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wurde der pH-Wert der Reaktionsmischung mit DIEA auf 9 eingestellt und eine weitere Stunde bei 80 °C gerührt. Nach Einkondensieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Laufmittel vorgereinigt. Eine weitere Reinigung erfolgte mittels RP8-Säulenchromatographie mit Wasser/Dioxan (10:1→ 5:1→ 2:1→ 1:1). Das Cyclopeptid wurde abschließend in Aceton aufgenommen und als weißer Feststoff durch Zugabe von Diethylether ausgefällt (laut HPLC zu 88% sauber). Die Verbindung konnte nicht analysenrein erhalten werden.

Ausbeute: 178 g (24 % d. Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 749.3  $[M-N_2+H]^+$  (70), 775.3  $[M+H]^+$  (100), 797.3  $[M+Na]^+$  (69), 813.3  $[M+K]^+$  (47)

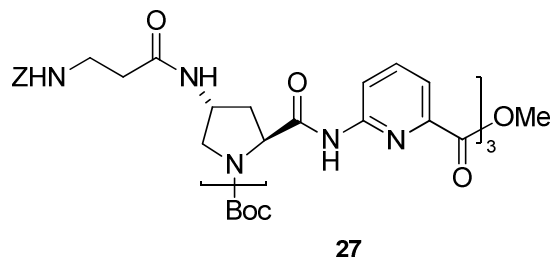
CCOC(=O)c1ccc(NC(=O)[C@H]2CC[C@@H](N2)C(=O)NCCCNC(=O)N)cc1

25

Ausbeute: 161 mg (37 % d.Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 907.5  $[M-Boc+H]^+$  (29), 929.5  $[M-Boc+Na]^+$  (6), 1007.6  $[M+H]^+$  (11), 1029.6  $[M+Na]^+$  (100), 1045.6  $[M+K]^+$  (79)

#### 6.4.34 Boc-[(Z- $\beta$ -Ala)Apro-Apa]<sub>3</sub>-OMe **27**

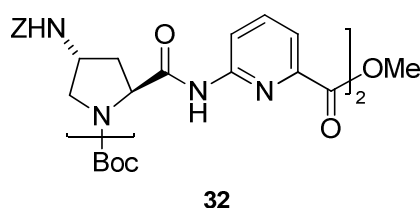


Das Tetrapeptid **25** (161 mg, 160  $\mu$ mol) wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am C-terminalen Ende entschützt und eine äquimolare Menge des Dipeptids **22** (91.1 mg, 160  $\mu$ mol) wurde am C-Terminus durch Verseifen entschützt. Die beiden Peptide wurden nun zusammen mit TBTU (61.6 mg, 192  $\mu$ mol, 1.2 equiv) und DIEA (89.2  $\mu$ l, 512  $\mu$ mol, 3.4 equiv) in DMF p.a. (20 ml) gelöst und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Mischung unter Rühren auf destilliertes Wasser (100 ml) gegossen. Der pH-Wert der Suspension wurde unter Kühlung mit 1 N Salzsäure auf  $\sim 4$  eingestellt und noch 10 min gerührt. Danach wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert.

Ausbeute: 69.4 mg (30 % d.Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 1366.8  $[M-Boc+Na]^+$  (68), 1383.8  $[M-Boc+K]^+$  (22), 1466.9  $[M+Na]^+$  (100), 1483.9  $[M+K]^+$  (6)

#### 6.4.35 Boc-[(Z)Apro-Apa]<sub>2</sub>-OMe **32**

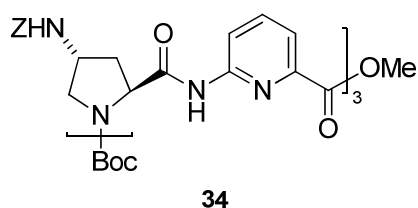


Das Dipeptid Boc-[(Z)Apro-Apa]-OMe **29** (1.45 g, 2.91 mmol) wurde am C-terminalen Ende gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Estergruppen* entschützt. Eine äquivalente Menge desselben Dipeptids wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am N-terminalen Ende entschützt. Die beiden teilentschützten Dipeptide wurden in trockenem Dichlormethan (50 ml) gelöst. TBTU (1.47 g, 3.49 mmol, 1.2 equiv) wurde zugegeben und anschließend wurde DIEA (1.72 ml, 9.89 mmol, 3.4 equiv) zugetropft. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel danach i.Vak. entfernt. Die chromatographische Reinigung des Produkts erfolgte mit Ethylacetat/Hexan 4:1 (v/v) als Elutionsmittel.

Ausbeute: 2.20 g (94 % d.Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 765.5  $[M-Boc+H]^+$  (16), 865.6  $[M+H]^+$  (32), 887.6  $[M+Na]^+$  (100), 903.5  $[M+K]^+$  (15)

#### 6.4.36 Boc-[(Z)Apro-Apa]<sub>3</sub>-OMe **34**

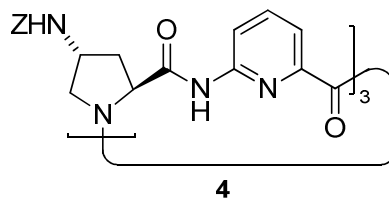


Das Dipeptid **29** (1.27 g, 2.55 mmol) wurde am C-terminalen Ende gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Estergruppen* entschützt. Eine äquivalente Menge des Tetrapeptids **32** wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am N-terminalen Ende entschützt. Die beiden teilentschützten Peptide sowie TBTU (886 mg, 2.76 mmol, 1.1 equiv) wurden in DMF (70 ml) gelöst und mit DIEA (1.40 ml, 8.03 mmol, 3.2 equiv) versetzt. Danach wurde die Reaktionsmischung 2 h bei Raumtemperatur gerührt und unter Rühren auf destilliertes Wasser (400 ml) gegossen. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 1 N Salzsäure auf ~4 eingestellt und danach wurde die Mischung noch 10 min gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert, mit destilliertem Wasser sowie Diethylether p.a. gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 2.76 g (89 % d.Th.) farbloses Pulver

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 1131.7  $[M-Boc+H]^+$  (17), 1231.8  $[M+H]^+$  (9), 1253.7  $[M+Na]^+$  (100), 1269.7  $[M+K]^+$  (44)

#### 6.4.37 *cyclo*{[(Z)Apro-Apa]<sub>3</sub>} **4**<sup>[43]</sup>



Für die Cyclisierung wurde das Hexapeptid **34** (1.23 g, 1.00 mmol) im ersten Schritt nach der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Estern* am C-terminalen Ende entschützt. Das am C-Terminus entschützte Hexapeptid wurde anschließend nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift Boc-entschützt und der entstandene Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet. TBTU (1.60 g, 5.00 mmol, 5 equiv) wurde in einem Kolben dreimal sekuriert, in entgastem DMF (200 ml) gelöst und mit DIEA (0.24 ml, 2.40 mmol, 2.4 equiv) versetzt. Anschließend wurde die Lösung auf 80 °C erhitzt und dann eine Lösung des vollständig entschützten Hexapeptids **35** sowie DIEA (1.04 ml, 6.00 mmol, 6 equiv) in entgastem DMF (40 ml) mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 4 h zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wurde der pH der Mischung mit DIEA auf 9 eingestellt und eine weitere Stunde bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens vorgereinigt. Die weitere Reinigung erfolgte mittels RP8-Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgradienten aus Wasser/Dioxan 10:1 → 5:1 → 2:1 → 3:2 → 2:3 (v/v). Die Fraktionen mit sauberem Produkt wurden i.Vak. zur Trockne eingengt, der Rückstand in Aceton aufgenommen und durch Eintropfen in Diethylether unter Rühren wieder ausgefällt. Der so erhaltene Feststoff wurde abfiltriert und anschließend getrocknet. Da dieses Produkt bereits literaturbekannt ist, wurde keine Elementaranalyse durchgeführt.

Ausbeute: 638 mg (58 % d.Th.) creme-farbener Feststoff

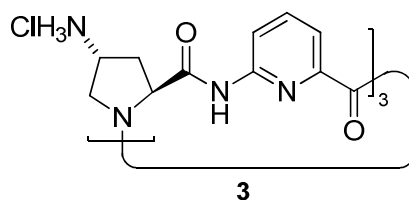
<sup>1</sup>H-NMR: [500 MHz, 25 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>]  $\delta$  = 2.23 (m, 3H, Apro H( $\beta$ )), 2.59 (m, 3H, Apro H( $\beta$ )), 3.51 (m, 3H, Apro H( $\delta$ )), 3.92 (m, 3H, Apro H( $\delta$ )), 4.05 (m, 3H, Apro H( $\gamma$ )), 5.04 (d,  $^2J$  = 12,0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>(Z)), 5.09 (d,



$^2J = 12.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2(\text{Z})$ ), 5.74 (m, 3H, Apro H( $\alpha$ )), 7.22 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 3H, Apa H(3)), 7.37 (m, 15H, -Ph), 7.48 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 3H, Apa H(5)), 7.76 (t,  $^3J = 8.2$  Hz, 6H, Apa H(4) + Apro NH), 9.58 (s, b, 3H, -NH-) ppm

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 965.7  $[\text{M}-\text{Z}+\text{H}]^+$  (63), 987.7  $[\text{M}-\text{Z}+\text{Na}]^+$  (32), 1003.7  $[\text{M}-\text{Z}+\text{K}]^+$  (10), 1099.8  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (73), 1121.8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), 1137.8  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (31)

#### 6.4.38 *cyclo*{[Apro-Apa]<sub>3</sub>} **3**<sup>[43]</sup>

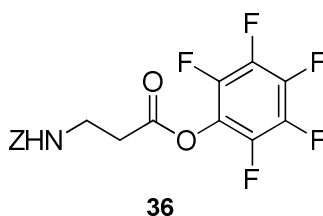


Cyclopeptid **4** (165 mg, 150  $\mu\text{mol}$ ) wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung der Z-Schutzgruppen* unter Zugabe von 1 N Salzsäure (540  $\mu\text{l}$ , 540  $\mu\text{mol}$ , 3.6 equiv) entschützt und direkt im Anschluss weiter umgesetzt.

Ausbeute: 117 mg (ca. 100 % d.Th.) gelber Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 697.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (20), 719.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), 735.4  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (5)

#### 6.4.39 Aktivester Z- $\beta$ -Ala-OPFP **36**



Z- $\beta$ -Ala-OH (1.23 g, 5.50 mmol, 1.1 equiv) sowie Pentafluorphenol (920 mg, 5.00 mmol) wurden in trockenem Ethylacetat (50 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde portionsweise EDC

(1.15 g, 6.00 mmol, 1.2 equiv) zugegeben und die Mischung anschließend 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde dreimal mit Wasser, dreimal mit 10 %iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung und dann wiederum dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 1.74 g (87 % d.Th.) farblose Kristalle

Schmelzpunkt: 52 °C

$^1\text{H-NMR}$ : [400 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 2.94 (t,  $^3J$  = 5.9 Hz, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.59 (q,  $^3J$  = 6.0 Hz, 2H,  $-\text{NH-CH}_2-$ ), 5.11 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Z})$ ), 5.20 (m, 1H, NH), 7.34 (m, 5H, PhH) ppm

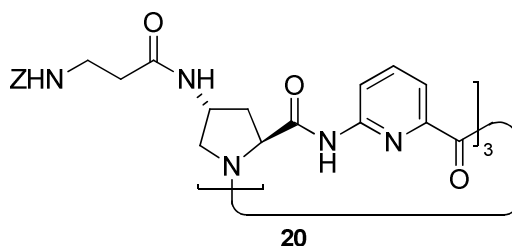
$^{13}\text{C-NMR}$ : [151 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = 33.9 ( $-\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 36.5 ( $-\text{NH-CH}_2-$ ), 67.1 ( $\text{CH}_2(\text{Z})$ ), 124.9 (PFP C(1)), 128.2, 128.3, 128.7 (Ph C(2-4)), 136.3 (Ph C(1)), 137.1, 138.8, 140.3, 142.0 (PFP C(2-4)), 156.4 ( $\text{CO}(\text{Z})$ ), 168.4 ( $\text{CO}(\text{PFP})$ ) ppm

$^{19}\text{F-NMR}$ : [376 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  = -162.0 (2 d,  $^3J$  = 19.7 Hz, 2F, F(3)), -157.5 (t,  $^3J$  = 20.2 Hz, 1F, F(4)), -152.5 (d,  $^3J$  = 16.4 Hz, 2F, F(2)) ppm

IR: [KBr] 3366 (s), 3071 (w), 3039 (w), 2986 (w), 2960 (w), 1794 (s), 1701 (s), 1519 (s), 1410 (w), 1368 (m), 1292 (m), 1260 (s), 1104 (s), 1001 (s), 972 (w), 860 (w), 753 (w), 697 (w)  $\text{cm}^{-1}$

CHN: ber C: 52.45 % H: 3.11 % N: 3.60 %  
gef C: 52.26 % H: 3.40 % N: 3.65 %  $M_w$ : 389.27  
 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{F}_5\text{NO}_4$

#### 6.4.40 *cyclo*{[(Z- $\beta$ -Ala)Apro-Apa]<sub>3</sub>} 20



Cyclopeptid **3**·3HCl (114 mg, 163  $\mu\text{mol}$ ) wurde in DMF p.a. (10 ml) gelöst und mit DIEA (85.2  $\mu\text{l}$ , 489  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv) versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus **36** (209 mg, 538  $\mu\text{mol}$ , 3.3 equiv) in Dichlormethan p.a. (10 ml) zugetropft und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol 10:1  $\rightarrow$  7.5:1  $\rightarrow$  5:1 (v/v) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels in wenig Aceton p.a. aufgenommen und unter Rühren in Diethylether p.a. ausgefällt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, in Wasser (HPLC grade) suspendiert und über Nacht gerührt. Die Suspension wurde zentrifugiert, das Wasser abdekantiert und das Produkt über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 135 mg (63 % d.Th.) farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 162 – 172 °C

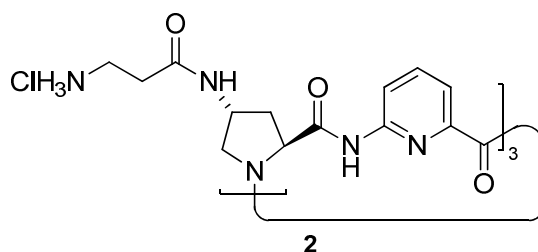
Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 1178.7  $[\text{M}-\text{Z}+\text{H}]^+$  (26), 1220.7  $[\text{M}-\text{Z}+\text{Na}]^+$  (5), 1216.7  $[\text{M}-\text{Z}+\text{K}]^+$  (1), 1312.8  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (88), 1334.8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), 1350.8  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (50)

$^1\text{H}$ -NMR: [600 MHz, 25 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 2.18 – 2.21 (m, 3H, Apro H( $\beta$ )), 2.25 – 2.30 (m, 3H, Ala (-CH<sub>2</sub>-CO-)), 2.31 – 2.38 (m, 3H, Ala (-CH<sub>2</sub>-CO-)), 2.46 – 2.52 (Apro H( $\beta$ ) unter dem DMSO-Signal), 3.22 (q,  $^3J$  = 6.96 Hz, 6H, Ala (-NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)), 3.43 – 3.45 (m, 3H, Apro H( $\delta$ )), 3.91 – 3.94 (m, 3H, Apro H( $\delta$ )), 4.21 – 4.23 (m, 3H Apro H( $\gamma$ )), 5.00 (s, 6H, CH<sub>2</sub>(Z)), 5.76 (m<sub>c</sub>, 3H, Apro H( $\alpha$ )), 7.24 (d,  $^3J$  = 8.16 Hz, 3H, Apa H(3)), 7.29 – 7.36 (m, 18H, Ala -NH- + Ph), 7.48 (d,  $^3J$  = 7.62 Hz, 3H, Apa H(5)), 7.75 (t,  $^3J$  = 7.98 Hz, 3H, Apa H(4)), 8.36 (d,  $^3J$  = 6.18 Hz, 3H, Apro -NH-), 9.75 (br s, 3H, Apa -NH-) ppm

$^{13}\text{C}$ -NMR: [151 MHz, 25 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 35.7 (Ala (-CH<sub>2</sub>-CO-)), 37.1 (Ala (-NH-CH<sub>2</sub>-)), 38.1 (C( $\beta$ )), 45.9 (C( $\gamma$ )), 52.5 (C( $\delta$ )), 60.6 (C( $\alpha$ )), 65.2 (CH<sub>2</sub>(Z)), 116.3 (Apa C(3)), 119.9 (Apa C(5)), 127.7 (Ph C(2)), 127.8 (Ph C(1)) 128.4 (Ph C(3)), 137.2 (Ph C(1)), 139.2 (Apa C(4)), 148.5 (Apa C(2)), 151.3 (Apa C(6)), 156.1 (Z CO), 165.9 (Apa CO), 170.5 (Apro CO), 171.1 (Ala CO) ppm

IR:	[KBr] 3304 (m), 3063 (w), 2949 (w), 1702 (s), 1654 (s), 1574 (s), 1534 (s), 1464 (s), 1400 (s), 1336 (m), 1298 (m), 1252 (m), 1182 (m), 1153 (m), 1067 (w), 994 (w), 822 (w), 759 (m), 697 (m) $\text{cm}^{-1}$				
Drehwert:	$[\alpha]_D^{22} = -184.3$ (c = 1, Methanol/Dichlormethan (1:1))				
CHN-Analyse:	ber	C: 58.40%	H: 5.49 %	N: 15.48 %	
	gef	C: 58.38 %	H: 5.46 %	N: 15.40 %	M <sub>w</sub> : 1357.50
	$\text{C}_{66}\text{H}_{69}\text{N}_{15}\text{O}_{15} \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$				

#### 6.4.41 *cyclo*{[( $\beta$ -Ala)Apro-Apa]<sub>3</sub>} **2**

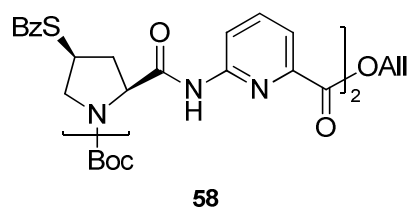


Cyclopeptid **20** (160 mg, 114  $\mu\text{mol}$ ) wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Z-Schutzgruppen* unter Zugabe von 1 N Salzsäure (375  $\mu\text{l}$ , 375  $\mu\text{mol}$ , 3.3 equiv) entschützt.

Ausbeute:	115 mg (99 % d.Th.) gelber Feststoff
Massenspektrum:	MALDI/TOF ( $m/z$ ): 910.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 932.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (74), 948.5 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (15)
$^1\text{H}$ -NMR:	[600 MHz, 25 °C, DMSO- $d_6$ ] $\delta$ = 2.21 (m <sub>c</sub> , 3H, Apro H( $\beta$ )), 2.43 (m <sub>c</sub> , 3H, Apro H( $\beta$ )), 2.52 (m, Ala (-CH <sub>2</sub> -CO-) unter dem DMSO-Signal), 2.99 (m <sub>c</sub> , 6H, Ala (-CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> )), 3.43 – 3.46 (m, 3H, Apro H( $\delta$ )), 3.95 – 3.98 (m, 3H, Apro H( $\delta$ )), 4.18 – 4.23 (m, 3H Apro H( $\gamma$ )), 6.36 – 6.39 (m, 3H, Apro H( $\alpha$ )), 7.42 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 3H, Apa H(3)), 7.53 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 3H, Apa H(5)), 7.76 (t, $^3J = 8.0$ Hz, 3H, Apa H(4)), 7.93 (br s, 9H, Ala -NH <sub>3</sub> ), 8.61 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, Apro -NH-), 10.77 (s, 3H, Apa -NH-)

$^{13}\text{C}$ - NMR:	[151 MHz, 25 °C, DMSO- $d_6$ ] $\delta$ = 32.1 (Ala (-CH <sub>2</sub> -CO-)), 35.3 (Ala (-N-CH <sub>2</sub> -)), 37.7 (C( $\beta$ )), 45.9 (C( $\gamma$ )), 52.9 (C( $\delta$ )), 60.5 (C( $\alpha$ )), 116.4 (Apa C(3)), 120.0 (Apa C(5)), 139.4 (Apa C(4)), 148.6 (Apa C(2)), 150.8 (Apa C(6)), 165.6 (Apa CO), 169.8 (Apro CO), 171.7 (Ala CO) ppm
IR:	[KBr] 3433 (s), 3257 (m), 3049 (m), 2925 (m), 1702 (m), 1687 (m), 1655 (s), 1637 (s), 1627 (s), 1572 (s), 1542 (s), 1466 (m), 1424 (m), 1400 (m), 1299 (m), 1261 (m), 1183 (m), 1155 (m), 1105 (m), 1017 (w), 992 (w), 822 (w), 760 (m), 670 (m), 651 (m) cm <sup>-1</sup>
Drehwert:	$[\alpha]_D^{22} = -140.3$ (c = 1, Methanol/Dichlormethan (1:1))
CHN-Analyse:	ber C: 40.53 % H: 6.40 % N: 16.88% gef C: 40.29 % H: 6.00 % N: 16.75 % M <sub>w</sub> : 1244.54 C <sub>42</sub> H <sub>54</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>15</sub> O <sub>9</sub> · 12.5 H <sub>2</sub> O

#### 6.4.42 Boc-[(Bz)Tpro-Apa]<sub>2</sub>-OAll 58

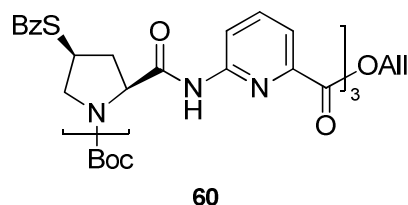


Dipeptid Boc-(Bz)Tpro-Apa-OAll **55** (1.03 g, 2.01 mmol) wurde am C-terminalen Ende gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Allylschutzgruppen* entschützt. Eine äquivalente Menge desselben Dipeptids wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am N-terminalen Ende entschützt. Die beiden so erhaltenen teilentschützten Dipeptide wurden in trockenem Dichlormethan (40 ml) gelöst. Nach Zugabe von PyCloP (1.02 g, 2.41 mmol, 1.2 equiv) und DIEA (1.19 ml, 6.83 mmol, 3.4 equiv) wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel danach i.Vak. entfernt. Die chromatographische Reinigung des Produkts erfolgte mit Ethylacetat/Pentan 2:1 (v/v) als Elutionsmittel.

Ausbeute: 1.47 g (85 % d.Th.) hellgelber Schaum

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 865.2  $[M+H]^+$  (12), 887.2  $[M+Na]^+$  (100), 903.2  $[M+K]^+$  (53)

#### 6.4.43 Boc-[(Bz)Tpro-Apa]<sub>3</sub>-OAll 60

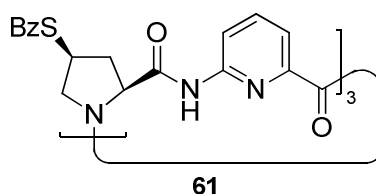


Das Dipeptid **55** (869 mg, 1.70 mmol) wurde am C-terminalen Ende gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Allylestergruppen* entschützt. Eine äquivalente Menge des Tetrapeptids **58** wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur *Spaltung von Boc-Gruppen* am N-terminalen Ende entschützt. Die beiden entschützten Peptide sowie TBTU (655 mg, 2.04 mmol, 1.2 equiv) wurden in DMF p.a. (50 ml) gelöst, mit DIEA (1.01 ml, 5.78 mmol, 3.4 equiv) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf destilliertes Wasser (250 ml) gegossen und der pH der gebildeten Suspension mit 1 N Salzsäure auf ~ 4 eingestellt. Nach 10 minütigem Rühren wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser sowie Diethylether p.a. gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1.82 g (93 % d.Th.) hellgelber Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 1118.4  $[M-Boc+H]^+$  (14), 1140.4  $[M-Boc+Na]^+$  (4), 1218.4  $[M+H]^+$  (10), 1240.4  $[M+Na]^+$  (100), 1256.4  $[M+K]^+$  (31)

#### 6.4.44 *cyclo*{[(Bz)Tpro-Apa]<sub>3</sub>} **61**<sup>[55]</sup>



Für die Cyclisierung wurde das Hexapeptid **60** (940 mg, 771  $\mu$ mol) zunächst nach der allgemeinen Vorschrift zur *Entschützung von Allylestern* am C-terminalen Ende entschützt.

Das Produkt wurde anschließend nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift Boc-entschützt. Der erhaltene Feststoff wurde nach Anreiben mit Diethylether p.a. i.Vak. getrocknet. TBTU (1.19 g, 3.72 mmol, 5 equiv) wurde in entgastem DMF p.a. (150 ml) gelöst, mit DIEA (311  $\mu$ l, 1.78 mmol, 2.4 equiv) versetzt und die Lösung auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung des vollständig entschützten Hexapeptids mit DIEA (777  $\mu$ l, 4.46 mmol, 6 equiv) in entgastem DMF (35 ml) mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 4 h zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wurde der pH der Mischung mit DIEA auf 9 eingestellt und eine weitere Stunde bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens vorgereinigt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde in wenig Aceton aufgenommen, auf eine mit Wasser/1,4-Dioxan 10:1 (v/v) vorkonditionierte RP8-Säule aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgradienten aus Wasser/Dioxan 10:1  $\rightarrow$  5:1  $\rightarrow$  2:1  $\rightarrow$  3:2  $\rightarrow$  2:3 (v/v) eluiert. Fraktionen mit sauberem Produkt wurden i.Vak. zur Trockne eingengt, der Rückstand in Aceton aufgenommen und durch Eintropfen in Diethylether unter Rühren wieder ausgefällt. Der so erhaltene gelbe Feststoff wurde abfiltriert und abschließend aus Dichlormethan/Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 489 mg (62 % d.Th.) hellgelber Feststoff

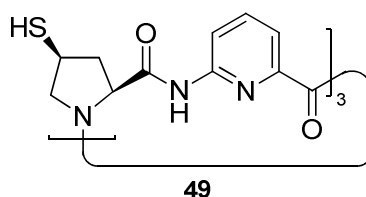
Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 1060.4  $[M+H]^+$  (29), 1082.4  $[M+Na]^+$  (100), 1098.4  $[M+K]^+$  (24)

$^1\text{H-NMR}$ : [600 MHz, 25 °C, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  = 2.23 (m, 3H, Tpro H( $\beta$ )), 3.22 (m, 3H, Tpro H( $\beta$ )), 3.62 (m, 3H, Tpro H( $\delta$ )), 4.17 (m, 3H, Tpro H( $\delta$ )), 4.22 (m, 3H, Tpro H( $\gamma$ )), 5.78 (m, 3H, Tpro H( $\alpha$ )), 7.39 (d,  $^3J$  = 8.3 Hz, 3H, Apa H(3)), 7.45 (d,  $^3J$  = 7.4 Hz, 3H, Apa H(5)), 7.53 (t,  $^3J$  = 7.8 Hz, 6H, Bz H(3)), 7.68 (t,  $^3J$  = 7.4 Hz, 3H, Bz H(4)), 7.76 (t,  $^3J$  = 8.0 Hz, 3H, Apa H(4)), 7.85 (d,  $^3J$  = 7.4 Hz, 6H, Bz H(2)), 9.92 (s, 3H, -NH-) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ : [151 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C]:  $\delta$  [ppm] 37.9 (C( $\gamma$ )), 38.3 (C( $\beta$ )), 53.0 (C( $\delta$ )), 61.2 (C( $\alpha$ )), 115.5 (Apa C(3)), 119.8 (Apa C(5)), 127.0 (Bz C(2)), 129.4 (Bz C(3)), 134.4 (Bz C(4)), 136.1 (Bz C(1)), 139.5 (Apa C(4)), 150.0 (Apa C(2)), 151.4 (Apa C(6)), 166.0 (Apa CO), 170.4 (Tpro CO), 191.0 (Bz CO) ppm

IR:	[KBr] $\text{cm}^{-1}$ 3398 (m), 3058 (w), 2949 (w), 1701 (m), 1654 (s), 1648 (s), 1576 (s), 1542 (m), 1522 (m), 1460 (s), 1400 (s), 1398 (s), 1301 (m), 1209 (s), 1176 (m), 1079 (w), 909 (s), 822 (w), 760 (m), 689 (m)			
CHN-Analyse:	ber	C: 59.66%	H: 4.45 %	N: 11.59 % S: 8.85 %
	gef	C: 59.64 %	H: 4.56 %	N: 11.76 % S: 8.80 %
	$\text{C}_{54}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}_3 \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$			$M_w$ : 1375.42

#### 6.4.45 *cyclo*{[Tpro-Apa]<sub>3</sub>} **49**



Cyclopeptid **61** (105 mg, 99.0  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter einer Schutzgasatmosphäre in trockenem, entgastem Methanol (80 ml) suspendiert. Es wurde DIEA (138  $\mu\text{l}$ , 792  $\mu\text{mol}$ , 8 equiv) zugegeben, so dass der pH zwischen 9 - 10 lag und anschließend wurde 10 d bei Raumtemperatur gerührt. Während dieser Zeit ging das Edukt in Lösung. Die Reaktionskontrolle erfolgte massenspektrometrisch mittels MALDI-MS. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel ohne Verwendung von Schutzgas bis auf wenige ml eingeeengt. Durch Zugabe von Diethylether p.a. wurde das Produkt ausgefällt. Es wurde abfiltriert und im Exsikkator aufbewahrt. Für die folgenden Reaktionen wurde es ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 74.0 mg (100 % d.Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: MALDI/TOF ( $m/z$ ): 748.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (5), 770.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), 786.4  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (30), 1515.8  $[2\cdot\mathbf{49}-\text{H}_2+\text{Na}]^+$  (75), 1531.8  $[2\cdot\mathbf{49}-\text{H}_2+\text{K}]^+$  (17), 2260.1  $[3\cdot\mathbf{49}-2\text{H}_2+\text{Na}]^+$  (24), 2276.1  $[3\cdot\mathbf{49}-2\text{H}_2+\text{K}]^+$  (4)



#### 6.4.46 Optimierung der Bibliothekszusammensetzung

Für die Untersuchungen zur Optimierung der Synthese des Bis(cyclopeptids) wurden die verschiedenen Reagenzien in Form von Stammlösungen eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen sind jeweils bei den Versuchsbeschreibungen angegeben. Cyclopeptid **49** wurde in der Regel in Acetonitril/Natronlauge (pH 11) unter Zugabe von Natriumsulfat (min. 0.5 equiv) gelöst und diese Stammlösung auf die Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die entsprechenden Verhältnisse sind bei den Versuchsbeschreibungen aufgeführt. Die Endkonzentration des Cyclopeptids **49** betrug bei fast allen Reaktionen 1.32 mM mit einem Verhältnis von Acetonitril/Natronlauge 2:1 (v/v).

##### 6.4.46.1 Variation der Menge an DTT

Konzentrationen der Stammlösungen:

- DTT: 50 mM (3.80 mg, 24.6  $\mu$ mol in wässriger NaOH (pH 11, 493  $\mu$ l))
- 1,2-Ethandithiol: 12 mM (18.7 mg, 199  $\mu$ mol in Acetonitril (16.5 ml))
- Natriumsulfat: 0.36 M (102 mg, 0.72 mmol in Wasser (2 ml))
- Cyclopeptid **49**: 2.85 mM (5.01 mg, 6.68  $\mu$ mol in Acetonitril (1.67 ml) und Natronlauge (pH 11, 576  $\mu$ l) und Natriumsulfatlösung (93.0  $\mu$ l))

Cyclopeptidtrithiol **49** (5.01 mg, 6.68  $\mu$ mol) wurde in Acetonitril (1.67 ml) suspendiert und mit der Natriumsulfatstammlösung (93  $\mu$ l, 33.5  $\mu$ mol, 5 equiv) versetzt. Zu dieser Suspension wurde noch Natronlauge (pH 11, 576  $\mu$ l) zugegeben, wobei das Edukt in Lösung ging. Anschließend wurde die erhaltene Lösung auf sechs Reaktionsgefäße aufgeteilt (jeweils 350  $\mu$ l), so dass sich in jedem Gläschen 1  $\mu$ mol des Cyclopeptids befand. Nun wurde DTT-Stammlösung zugegeben. Die verwendeten Volumina sind in Tabelle 16 angegeben. Um die gleiche Zugabemenge des Lösungsmittels gewährleisten zu können, wurde entsprechend Natronlauge (pH 11) zudosiert.

Tabelle 16 Zugabe an DTT sowie zugehörige Menge

equiv DTT	0	1	2	3	4	5
Zugabe DTT-Lösung / $\mu$ l	-	20	40	60	80	100
Zugabe Natronlauge / $\mu$ l	100	80	60	40	20	-

Da die Konzentration des Cyclopeptids 1.32 mM betragen sollte, wurde schließlich zu jedem Ansatz noch weiteres Acetonitril (130  $\mu$ l) sowie Natronlauge (pH 11, 52.5  $\mu$ l) gegeben und nach einer halbe Stunde Rühren schließlich 1,2-Ethandithiol (125  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ mol, 1.5 equiv) zugesetzt. Für die Kontrolle der Reaktion wurde nach 24 h sowie 48 h ein HPLC Chromatogramm aufgenommen.

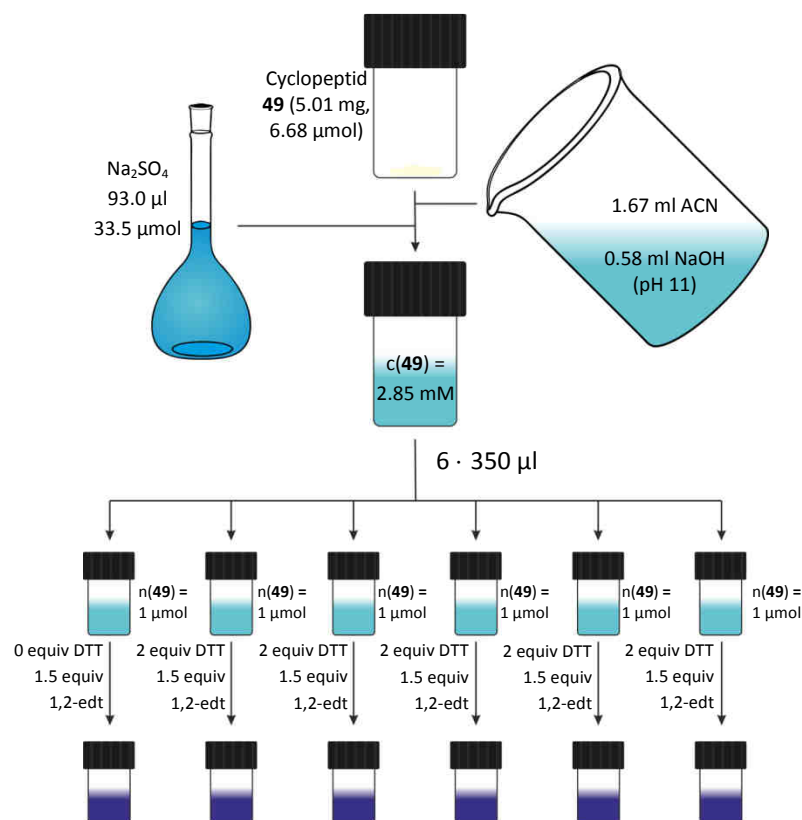


Abb. 80: Flussdiagramm für die Durchführung der verschiedenen Reaktionen.

#### 6.4.46.2 Variation der Menge des Linkers

Konzentrationen der Stammlösungen:

- 1,2-Ethandithiol: 0.1 M (5.71 mg, 60.5  $\mu$ mol in Acetonitril (605  $\mu$ l))
- Natriumsulfat: 0.36 M (102 mg, 0.72 mmol in Wasser (2 ml))
- Cyclopeptid **49**: 1.65 mM (3.19 mg, 4.28  $\mu$ mol in Acetonitril (1.52 ml) und Natronlauge (pH 11, 1.02 ml) + Natriumsulfatlösung (59.4  $\mu$ l))

Cyclopeptidtrithiol **49** (3.2 mg, 4.28  $\mu\text{mol}$ ) wurde in Acetonitril (1.52 ml) suspendiert und mit Natronlauge (pH 11, 1.02 ml) versetzt. Zu dieser Suspension wurde anschließend die Natriumsulfatstammlösung (59.4  $\mu\text{l}$ , 21.4  $\mu\text{mol}$ , 5 equiv) gegeben und die erhaltene Lösung auf sechs Reaktionsgefäße aufgeteilt (jeweils 406  $\mu\text{l}$ ), so dass sich in jedem Gläschen 0.67  $\mu\text{mol}$  des Cyclopeptids befand. Im Anschluss wurde 1,2-Ethandithiol in den entsprechenden Mengen (Tabelle 17) zugesetzt. Um Volumen konstant halten und eine Konzentration von 1.32 mM erreichen zu können, wurde die entsprechende Menge an Acetonitril zugegeben.

Tabelle 17    Zugesetzte Mengen des Linkers sowie entsprechende Volumina an Acetonitril

equiv Linker	1.5	3	6	9	12	15
Zugabe 1,2-edt-Lösung / $\mu\text{l}$	10	20	40	60	80	100
Zugabe Acetonitril / $\mu\text{l}$	90	80	60	40	20	-

Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC nach einem bzw. zwei Tagen. Rein optisch unterschieden sich die verschiedenen Ansätze deutlich voneinander. So war in den Reaktionsgefäßen mit einem großen Überschuss des Linkers auch mehr Feststoff ausgefallen.

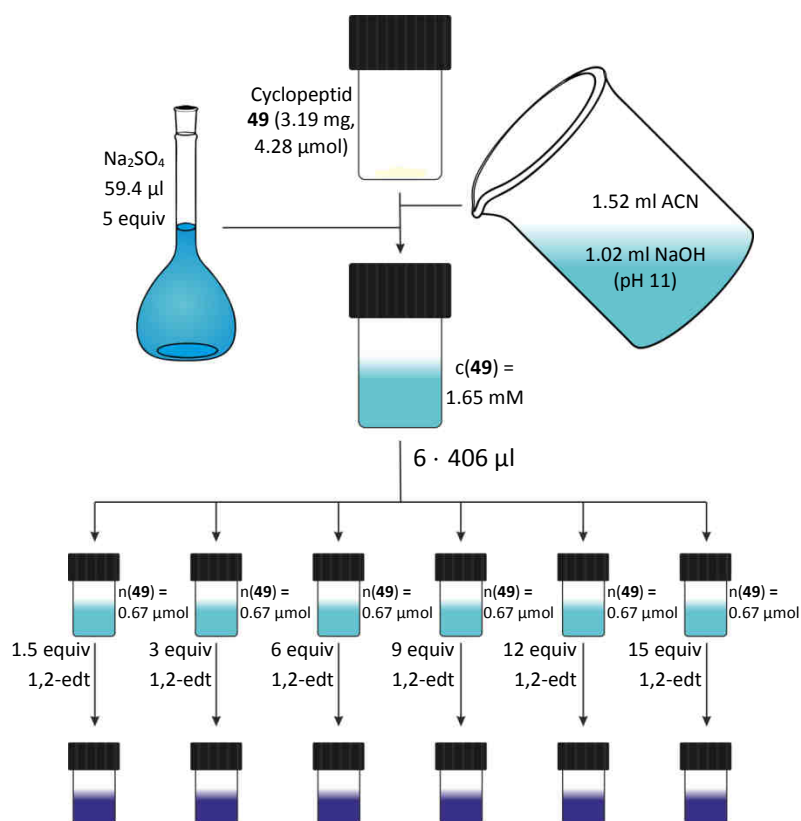


Abb. 81: Flussdiagramm für die Durchführung der verschiedenen Reaktionen.

#### 6.4.46.3 Variation der Templätäquivalente

Konzentrationen der Stammlösungen:

- 1,2-Ethandithiol: 12 mM (18.7 mg, 199  $\mu\text{mol}$  in Acetonitril (16.5 ml))
- Natriumsulfat: 0.36 M (102 mg, 0.72 mmol in Wasser (2 ml))
- Cyclopeptid **49**: 1.80 mM (3.21 mg, 4.28  $\mu\text{mol}$ ) in Acetonitril (1.54 ml) und Natronlauge (pH 11, 842  $\mu\text{l}$ ) + Natriumsulfatlösung (11.9  $\mu\text{l}$ ) + 1,2-Ethandithiolsammlösung (624  $\mu\text{l}$ )

Cyclopeptid **49** (3.21 mg, 4.28  $\mu\text{mol}$ ) wurde in Acetonitril (1.54 ml) suspendiert und mit Natronlauge (pH 11, 842  $\mu\text{l}$ ) versetzt. Zu dieser Suspension wurde zunächst Natriumsulfat (11.9  $\mu\text{l}$ , 4.28  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv) zugegeben, wobei das Edukt in Lösung ging, und direkt im Anschluss 1,2-Ethandithiol (624  $\mu\text{l}$ , 7.49  $\mu\text{mol}$ , 1.75 equiv) zugesetzt. Von dieser Lösung wurden nun jeweils 471  $\mu\text{l}$  abgenommen und auf fünf Gefäße aufgeteilt, so dass in jedem Ansatz die gleiche Menge an Cyclopeptid (0.67  $\mu\text{mol}$ ) vorhanden war. Zu den verschiedenen

Reaktionen, in denen bereits 1 equiv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  vorhanden war, wurde nun entweder Wasser oder zusätzliche Linkerlösung (0.36 M) gegeben, so dass die Cyclopeptidkonzentration entsprechend 1.32 mM betrug (Tabelle 18).

Tabelle 18 Zugesezte Menge des Linkers sowie entsprechende Volumina an Acetonitril

equiv Templat	1	2	5	10	15	20
Zugabe Natriumsulfat / $\mu\text{l}$	-	1.9	7.4	16.7	26.0	35.3
Zugabe Acetonitril / $\mu\text{l}$	35.3	33.4	27.9	18.6	9.3	-

Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC nach einem bzw. zwei Tagen.

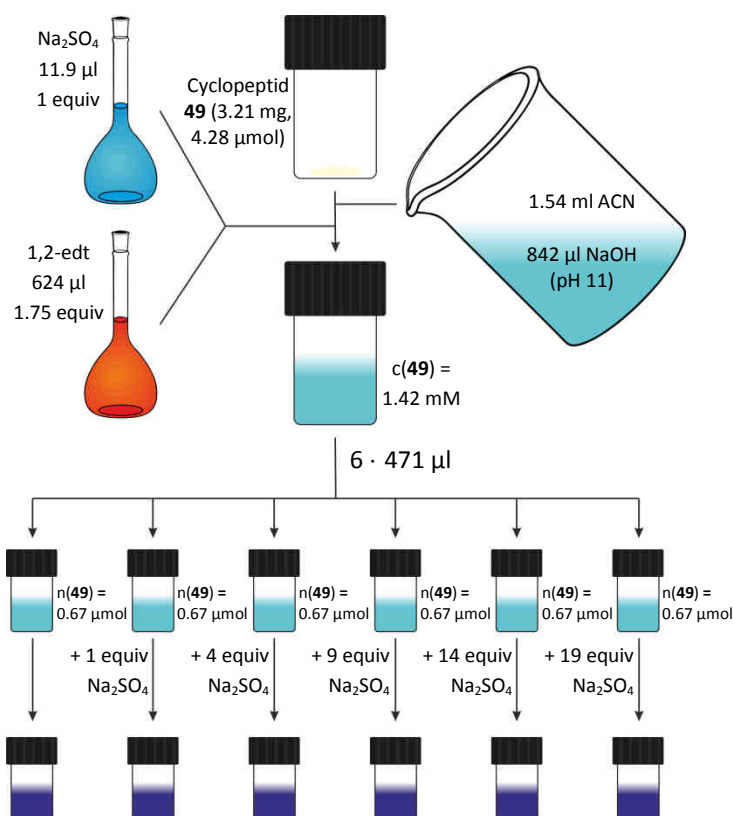


Abb. 82: Flussdiagramm für die Durchführung der verschiedenen Reaktionen.

**6.4.46.4 Variation der Templatmenge sowie der Konzentration**

Konzentrationen der Stammlösungen:

- 1,2-Ethandithiol: 8 mM (16.1 mg, 170  $\mu\text{mol}$  in Acetonitril (21.2 ml))
- Natriumsulfat: 50 mM (21.8 mg, 154  $\mu\text{mol}$  in Wasser (3.07 ml))
- Cyclopeptid **49**: 1.32 mM (2.10 mg, 2.81  $\mu\text{mol}$ ) in Acetonitril (804  $\mu\text{l}$ ) und Natronlauge (pH 11, 709  $\mu\text{l}$ ) + 1,2-Ethandithiolsammlösung (614  $\mu\text{l}$ )

Cyclopeptidtrithiol **49** (2.10 mg, 2.81  $\mu\text{mol}$ ) wurde in Acetonitril (804  $\mu\text{l}$ ) suspendiert und mit Natronlauge (pH 11, 709  $\mu\text{l}$ ) versetzt. Zu dieser Suspension wurde die 1,2-Ethandithiolsammlösung (614  $\mu\text{l}$ , 7.49  $\mu\text{mol}$ , 1.75 equiv) zugesetzt. Von der Reaktionsmischung wurden nun dreimal 500  $\mu\text{l}$  (0.66  $\mu\text{mol}$  **49**) und einmal 350  $\mu\text{l}$  (0.46  $\mu\text{mol}$  **49**) abgenommen und auf vier Gefäße aufgeteilt. Dazu wurden dann entsprechende Mengen der Natriumsulfatstammlösung zugesetzt (Tabelle 19). Zusätzlich wurde zu zwei Reaktionen noch Lösungsmittel (Acetonitril/Natronlauge (pH 11) 2:1 (v/v)) zugesetzt, so dass die Konzentration von **49** in diesen Mischungen auf 0.66 mM halbiert wurde.

Tabelle 19 Stoffmenge sowie Volumina der Natriumsulfatlösung sowie des reinen Lösungsmittels

		0.5 equiv Templat	1 equiv Templat
Konzentration 1.32 mM	n (CP) / $\mu\text{mol}$	0.66	0.66
	Zugabe $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung / $\mu\text{l}$	6.6	13.2
	Zugabe LM / $\mu\text{l}$	-	-
Konzentration 0.66 mM	n (CP) / $\mu\text{mol}$	0.66	0.46
	Zugabe $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung / $\mu\text{l}$	6.6	9.2
	Zugabe LM / $\mu\text{l}$	500	350

LM: Acetonitril/Natronlauge (pH 11) 2:1 (v/v)

Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der analytischen HPLC nach einem bzw. zwei Tagen.

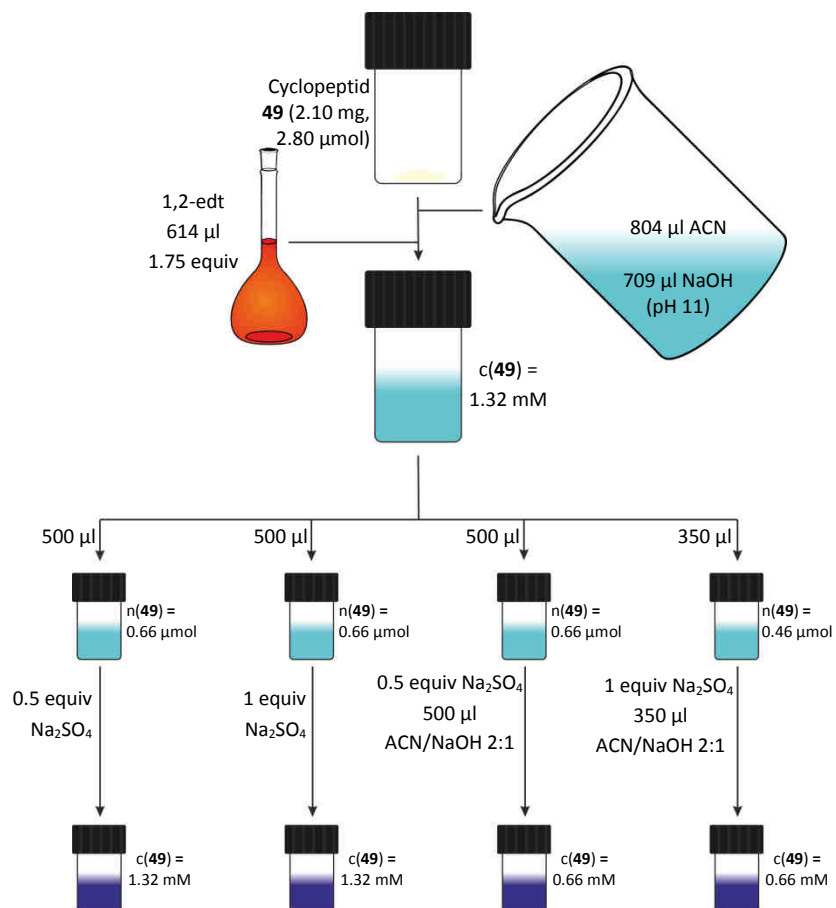
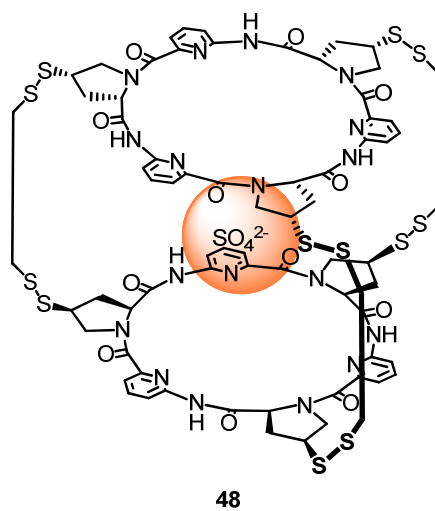


Abb. 83: Flussdiagramm für die Durchführung der verschiedenen Reaktionen.

#### 6.4.47 Bis(*cyclo*{[Tpro-Apa]<sub>3</sub>}[1,2-edt]<sub>3</sub>) **49**<sup>[55]</sup>



Konzentrationen der Stammlösungen:

- 1,2-Ethandithiol: 12 mM (20.7 mg, 220  $\mu$ mol in Acetonitril (18.3 ml))
- Natriumsulfat: 0.36 M (116 mg, 815  $\mu$ mol in Wasser (2.26 ml))

Cyclopeptidtrithiol **49** (28.9 mg, 38.6  $\mu$ mol) wurde in einem Kolben vorlegt und dann zunächst Acetonitril (33.4 ml) und dann Natronlauge (pH 11, 19.5 ml) zugegeben. Anschließend wurde die Natriumsulfatlösung (80.5  $\mu$ l, 30.0  $\mu$ l, 0.75 equiv) hinzugefügt, wobei das Edukt in Lösung ging. Nach Zugabe der 1,2-Ethandithiollösung (5.64 ml, 67.6  $\mu$ mol, 1.75 equiv) wurde der pH überprüft und gegebenenfalls durch Zugabe von Natronlauge (pH 13) auf einen Wert von 10 – 11 eingestellt. Die Cyclopeptidkonzentration betrug nach vollständiger Zugabe aller Reagenzien 0.66 mM. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach beendeter Reaktion (üblicherweise 3 d) der pH-Wert mit NaHSO<sub>4</sub> (1 M) auf < 7 eingestellt. Das Lösungsmittelgemisch wurde i.Vak. entfernt, der Rückstand in wenig DMSO p.a. gelöst und über die präparative HPLC mit 0.1 % TFA sowie 0.075 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Laufmittel gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft und nur die sauberen Fraktionen vereinigt (Reinheit  $\geq$  98 %). Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand in wenig Methanol/H<sub>2</sub>O 2:1 (v/v) gelöst. Nach 21 d Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde das ausgefallene Produkt abfiltriert.

Ausbeute: 7.8 mg (21 % d.Th.) farbloser Feststoff

Massenspektrum: ESI/TOF ( $m/z$ ): 930.9 (100) [M+SO<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>

<sup>1</sup>H-NMR: [600 MHz, 25 °C, CD<sub>3</sub>CN/D<sub>2</sub>O 2:1 (v/v)]  $\delta$  = 2.35 (m, 6H, Tpro H( $\beta$ )), 2.46 (m, 6H, DTE), 2.71 (m, 6H, DTE), 3.21 (m, 6H, Tpro H( $\beta$ )), 3.49 (m, 6H, Tpro H( $\delta$ )), 3.66 (m, 6H, Tpro H( $\delta$ )), 3.94 (m, 3H, Tpro H( $\gamma$ )), 6.94 (m, 6H, Tpro H( $\alpha$ )), 7.60 (d, <sup>3</sup> $J$  = 8.3 Hz, 6H, Apa H(3)), 7.78 (d, <sup>3</sup> $J$  = 7.4 Hz, 6H, Apa H(5)), 7.86 (t, <sup>3</sup> $J$  = 8.0 Hz, 6H, Apa H(4)), 12.00 (s, 6H, -NH-) ppm



Gradient für HPLC Elution:

Säule: Supelco Ascentis® C18-Säule (25 cm x 21.2 mm, 5 µm)

UV-Detektion: 254 nm

Fluß: 9 ml/min

Tabelle 20 Lösungsmittelgradient für die Aufreinigung des Bis(cyclopeptids) **48**

t / min	Wasser (0.1 % TFA, 0.075 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) / %	ACN (0.1 % TFA) / %
0.0	100	0
4.5	100	0
7.0	75	25
40.0	50	50
53.0	10	90
57.0	10	90
65.0	100	0
70.0	100	0

Kristallstruktur

Identifikationscode	Kubic3_120913
Summenformel	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Na}_{0.33333}\text{O}_{5.33333}\text{S}_{4.33333}$
Molmasse	627.41
Temperature/K	123.01(10)
Kristallsystem	kubisch
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 3
Zelldimensionen	$a = 22.2324(3) \text{ \AA} \quad \alpha = 90^\circ$ $b = 22.2324(3) \text{ \AA} \quad \beta = 90^\circ$ $c = 22.2324(3) \text{ \AA} \quad \gamma = 90^\circ$
Volumen	$10989.1(3) \text{ \AA}^3$
Z	12
berechnete Dichte	$1.138 \text{ mg/mm}^3$
Absorptionskoeffizient	$2.921 \text{ mm}^{-1}$
F(000)	3896.0
Kristallgröße	$0.15 \times 0.12 \times 0.08 \text{ mm}^3$
Gemessener $\theta$ -Bereich	$6.88 \text{ to } 142.56^\circ$
Indexgrenzen	$-11 \leq h \leq 26, -25 \leq k \leq 11, -20 \leq l \leq 17$
Anzahl der gemessenen Reflexe	12324
Unabhängige Reflexe	5782[R(int) = 0.0326]
Daten / Restraints / Parameter	5782/23/230
Goodness-of-fit on $F^2$	1.137
Endgültige R-Werte [ $I > 2 \sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.1247, wR_2 = 0.3419$
R-Werte (alle Daten)	$R_1 = 0.1598, wR_2 = 0.3739$
Größtes Maximum und Minimum	$0.37/-0.35 \text{ e \AA}^{-3}$
Flack Parameter	0.21(7)

Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) für Kubic3\_120913.  $U_{\text{equiv}}$  ist definiert als 1/3 der Spur des orthogonalisierten  $U_{\text{H}}$  Tensors.

Atom	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>U</i> (equiv)
S1	4510.1(11)	4510.1(11)	4510.1(11)	103.0(11)
O2	4480(3)	4274(5)	5111(4)	171(4)
N3	6130(3)	3315(4)	5907(3)	108(2)
N4	5077(3)	4525(3)	6193(3)	115(2)
C5	5489(6)	2542(4)	5852(6)	175(6)
C9	6668(9)	3533(6)	5861(5)	175(7)
O12	5826(4)	4145(4)	6724(4)	159(3)
C22	5497(5)	4146(6)	6307(4)	124(3)
C25	6080(4)	2684(4)	6088(4)	113(3)
O26	7109(3)	3215(3)	6081(3)	125.0(19)
C28	5115(4)	3210(5)	5942(6)	142(4)
C36	5565(4)	3619(3)	5818(4)	93.0(19)
C45	6741(3)	4179(3)	5732(3)	147.4(17)
N49	6416(3)	4416(3)	5254(3)	147.4(17)
C52	6607(3)	4943(3)	4977(3)	147.4(17)
C8	7124(3)	5232(3)	5177(3)	147.4(17)
C63	7449(3)	4995(3)	5656(3)	147.4(17)
C7	7257(3)	4468(3)	5933(3)	147.4(17)
S51	5075(5)	1935(3)	6160(5)	339(4)
N8	3230(4)	4938(5)	3563(3)	144(3)
C10	2012(3)	4478(5)	4505(2)	188(3)
N11	2562(3)	4688(5)	4295(3)	188(3)
C67	2666(3)	4732(5)	3680(3)	188(3)
C16	2219(3)	4567(5)	3275(2)	188(3)
C29	1669(3)	4358(5)	3485(3)	188(3)
C17	1565(3)	4313(5)	4100(3)	188(3)
O14	1426(3)	4498(5)	5303(4)	183(4)
C18	4052(8)	5409(7)	3077(5)	156.5(19)
C19	2305(7)	4329(6)	6167(4)	156.5(19)
C35	3523(8)	5085(5)	2989(4)	151(5)
C53	1996(5)	4327(6)	5168(5)	143(4)
C61	4132(7)	5957(6)	3387(4)	156.5(19)
O64	3208(4)	5087(5)	2526(3)	186(4)
O1	4102(3)	4102(3)	4102(3)	168(5)
Na2	495.1(16)	4504.9(16)	5495.1(16)	115.8(16)
N6	2398(6)	4224(5)	5488(4)	156.5(19)
C1	2851(6)	4157(6)	6489(4)	156.5(19)
S2	3186(4)	3157(3)	7236(4)	302(3)
S3	3182(5)	4026(3)	7209(5)	339(4)
C20	3849(6)	2315(11)	6893(10)	315(13)
S4	4672(3)	2119(3)	6945(4)	302(3)
C2	3943(7)	2829(9)	7330(10)	315(13)

anisotrope Auslenkungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) für Kubic3\_120913. Der Exponent des anisotropen Auslenkungsfaktors nimmt folgende Form an:  $-2\pi^2[h^2a^{*2}U_{11}+...+2hka \times b \times U_{12}]$

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
S1	103.0(11)	103.0(11)	103.0(11)	21.7(13)	21.7(13)	21.7(13)
O2	79(3)	259(9)	175(7)	92(7)	-23(4)	-4(4)
N3	79(4)	170(8)	77(4)	3(4)	-11(3)	-1(4)
N4	75(4)	159(6)	110(5)	-57(4)	-9(3)	53(4)
C5	238(14)	84(6)	205(12)	-18(6)	-	0(7)
C9	273(18)	136(9)	115(7)	45(6)	67(9)	135(11)
O12	155(6)	182(7)	140(6)	-2(5)	-51(5)	68(5)
C22	113(7)	183(10)	76(5)	10(5)	8(5)	-49(7)
C25	120(6)	121(7)	97(5)	2(5)	-18(5)	-47(5)
O26	114(4)	127(4)	134(5)	44(4)	-26(3)	3(3)
C28	81(5)	154(8)	192(10)	-25(7)	-37(6)	28(6)
C45	116(3)	161(4)	165(4)	44(3)	-24(2)	-43(3)
N49	116(3)	161(4)	165(4)	44(3)	-24(2)	-43(3)
C52	116(3)	161(4)	165(4)	44(3)	-24(2)	-43(3)
C8	116(3)	161(4)	165(4)	44(3)	-24(2)	-43(3)
C63	116(3)	161(4)	165(4)	44(3)	-24(2)	-43(3)
C7	116(3)	161(4)	165(4)	44(3)	-24(2)	-43(3)
S51	408(9)	192(4)	417(9)	39(5)	62(7)	46(5)
N8	134(6)	214(9)	85(5)	-11(5)	-22(4)	52(6)
C10	121(3)	335(8)	108(3)	-38(4)	11(2)	59(4)
N11	121(3)	335(8)	108(3)	-38(4)	11(2)	59(4)
C67	121(3)	335(8)	108(3)	-38(4)	11(2)	59(4)
C16	121(3)	335(8)	108(3)	-38(4)	11(2)	59(4)
C29	121(3)	335(8)	108(3)	-38(4)	11(2)	59(4)
C17	121(3)	335(8)	108(3)	-38(4)	11(2)	59(4)
O14	119(5)	269(10)	162(7)	-105(7)	39(5)	-60(6)
C18	222(6)	163(4)	84(3)	-12(2)	-17(3)	11(4)
C19	222(6)	163(4)	84(3)	-12(2)	-17(3)	11(4)
C35	270(15)	108(7)	74(6)	-4(5)	30(8)	58(8)
C53	122(7)	207(11)	100(6)	-64(7)	31(6)	-83(7)
C61	222(6)	163(4)	84(3)	-12(2)	-17(3)	11(4)
O64	179(7)	295(11)	85(4)	47(5)	-74(4)	-77(7)
O1	168(5)	168(5)	168(5)	-35(4)	-35(4)	-35(4)
Na2	115.8(16)	115.8(16)	115.8(16)	-8.2(18)	8.2(18)	-8.2(18)
N6	222(6)	163(4)	84(3)	-12(2)	-17(3)	11(4)
C1	222(6)	163(4)	84(3)	-12(2)	-17(3)	11(4)
S2	319(6)	235(4)	352(7)	103(4)	-104(5)	-40(4)
S3	408(9)	192(4)	417(9)	39(5)	62(7)	46(5)
C20	136(8)	550(40)	250(20)	30(20)	-49(11)	76(15)
S4	319(6)	235(4)	352(7)	103(4)	-104(5)	-40(4)
C2	136(8)	550(40)	250(20)	30(20)	-49(11)	76(15)

Bindungslängen [Å] für Kubic3\_120913.

Atom	Atom	Länge/Å	Atom	Atom	Länge/Å
S1	O2	1.436(7)	C10	N11	1.3900
S1	O2 <sup>1</sup>	1.436(7)	C10	C17	1.3900
S1	O2 <sup>2</sup>	1.436(7)	C10	C53	1.512(12)
S1	O1	1.570(13)	N11	C67	1.3900
N3	C9	1.30(2)	C67	C16	1.3900
N3	C25	1.465(12)	C16	C29	1.3900
N3	C36	1.441(11)	C29	C17	1.3900
N4	C22	1.284(14)	O14	C53	1.356(14)
N4	C52 <sup>1</sup>	1.39(2)	O14	Na2	2.114(8)
C5	C25	1.450(14)	C18	C35	1.394(18)
C5	C28	1.713(15)	C18	C61	1.411(18)
C5	S51	1.770(13)	C18	N6 <sup>1</sup>	1.567(16)
C9	O26	1.304(14)	C19	N6	1.542(14)
C9	C45	1.473(14)	C19	C1	1.461(18)
O12	C22	1.182(11)	C35	O64	1.244(14)
C22	C36	1.605(13)	C53	N6	1.165(14)
C28	C36	1.379(13)	C61	C1 <sup>1</sup>	1.679(17)
C45	N49	1.3900	Na2	O14 <sup>3</sup>	2.114(8)
C45	C7	1.3900	Na2	O14 <sup>4</sup>	2.114(8)
N49	C52	1.3900	N6	C18 <sup>2</sup>	1.567(16)
C52	N4 <sup>2</sup>	1.394(7)	C1	C61 <sup>2</sup>	1.679(17)
C52	C8	1.3900	C1	S3	1.786(13)
C8	C63	1.3900	S2	S3	1.931(9)
C63	C7	1.3900	S2	C2	1.848(12)
S51	S4	2.006(8)	C20	S4	1.884(13)
N8	C67	1.360(11)	C20	C2	1.514(17)
N8	C35	1.471(13)			

<sup>1</sup>+Y,+Z,+X; <sup>2</sup>+Z,+X,+Y; <sup>3</sup>-1/2+Z,1/2-X,1-Y; <sup>4</sup>1/2-Y,1-Z,1/2+X

Bindungswinkel [°] für Kubic3\_120913.

Atom	Atom	Atom	Winkel / °	Atom	Atom	Atom	Winkel / °
O2	S1	O2 <sup>1</sup>	111.5(4)	N11	C10	C17	120.0
O2	S1	O2 <sup>2</sup>	111.5(4)	N11	C10	C53	114.9(6)
O2 <sup>1</sup>	S1	O2 <sup>2</sup>	111.5(4)	C17	C10	C53	123.8(6)
O2	S1	O1	107.4(4)	C67	N11	C10	120.0
O2 <sup>1</sup>	S1	O1	107.4(4)	N8	C67	N11	111.5(5)
O2 <sup>2</sup>	S1	O1	107.4(4)	N8	C67	C16	128.5(5)
C9	N3	C25	116.8(8)	N11	C67	C16	120.0
C9	N3	C36	128.3(8)	C67	C16	C29	120.0
C36	N3	C25	114.9(7)	C17	C29	C16	120.0
C22	N4	C52 <sup>1</sup>	119.8(11)	C29	C17	C10	120.0
C25	C5	C28	102.1(7)	C53	O14	Na2	164.0(9)
C25	C5	S51	119.7(8)	C35	C18	C61	128.4(14)
C28	C5	S51	111.3(10)	C35	C18	N6 <sup>1</sup>	97.4(9)
N3	C9	O26	117.5(11)	C61	C18	N6 <sup>1</sup>	110.1(11)
N3	C9	C45	118.7(9)	C1	C19	N6	109.2(12)
O26	C9	C45	121.3(17)	C18	C35	N8	111.5(10)
N4	C22	C36	114.5(8)	O64	C35	N8	118.1(14)
O12	C22	N4	127.3(11)	O64	C35	C18	126.0(10)
O12	C22	C36	118.1(12)	O14	C53	C10	100.0(11)
C5	C25	N3	100.2(7)	N6	C53	C10	128.4(9)
C36	C28	C5	101.3(8)	N6	C53	O14	129.5(10)
N3	C36	C22	109.4(7)	C18	C61	C1 <sup>1</sup>	105.5(8)
C28	C36	N3	107.3(7)	O14	Na2	O14 <sup>3</sup>	101.1(5)
C28	C36	C22	106.2(8)	O14	Na2	O14 <sup>4</sup>	101.1(5)
N49	C45	C9	117.5(8)	O14 <sup>3</sup>	Na2	O14 <sup>4</sup>	101.1(5)
N49	C45	C7	120.0	C19	N6	C18 <sup>2</sup>	106.0(10)
C7	C45	C9	118.6(9)	C53	N6	C18 <sup>2</sup>	135.9(10)
C52	N49	C45	120.0	C53	N6	C19	117.8(12)
N49	C52	N4 <sup>2</sup>	107.2(4)	C19	C1	C61 <sup>2</sup>	104.6(9)
N49	C52	C8	120.0	C19	C1	S3	145.6(11)
C8	C52	N4 <sup>2</sup>	132.7(4)	C61 <sup>2</sup>	C1	S3	109.5(9)
C63	C8	C52	120.0	C2	S2	S3	113.7(8)
C7	C63	C8	120.0	C1	S3	S2	101.1(7)
C63	C7	C45	120.0	C2	C20	S4	90.0(10)
C5	S51	S4	114.4(7)	C20	S4	S51	115.3(7)
C67	N8	C35	130.5(9)	C20	C2	S2	95.7(10)

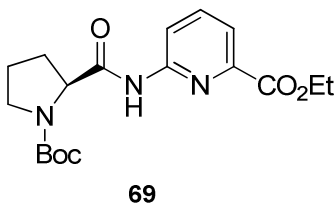
<sup>1</sup>+Y,+Z,+X; <sup>2</sup>+Z,+X,+Y; <sup>3</sup>-1/2+Z,1/2-X,1-Y; <sup>4</sup>1/2-Y,1-Z,1/2+X

Koordinaten für die Wasserstoffatome ( $\text{\AA} \times 10^4$ ) und Isotrope  
Auslenkungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) für Kubic3\_120913.

Atom	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U(equiv)
H4	4878	4501	5862	138
H5	5531	2470	5419	211
H25A	6390	2438	5904	135
H25B	6096	2638	6522	135
H28A	4783	3247	5660	171
H28B	4964	3256	6349	171
H36	5530	3776	5407	112
H8	7252	5584	4992	177
H63	7795	5188	5790	177
H7	7475	4309	6253	177
H8A	3452	4990	3876	173
H16	2289	4597	2864	226
H29	1370	4247	3213	226
H17	1197	4173	4240	226
H18	4344	5126	3247	188
H19	1957	4479	6343	188
H61A	4503	5952	3616	188
H61B	3799	6029	3660	188
H1	2762	3728	6438	188
H20A	3725	2444	6495	378
H20B	3585	2002	7045	378
H2A	4261	3100	7203	378
H2B	4017	2691	7737	378

## 6.4.48 Katalysereaktionen

## 6.4.48.1 Ullmann-Kupplung mit Prolinamid



L-Prolinamid **16** (107 mg, 0.50 mmol), 6-Brompicolinsäureethylester (135 mg, 0.59 mmol, 1.2 equiv), Kupfer(I)iodid (9.5 mg, 49.9  $\mu$ mol, 10 mol%) sowie Kaliumphosphat (221 mg, 1.04 mmol, 2 equiv) wurden unter einer Argonatmosphäre in einem zuvor ausgeheizten Kolben vorgelegt. Dann wurde trockenes, entgastes Toluol (5 ml) und anschließend *N,N'*-Dimethylethylendiamin (5.4  $\mu$ l, 50.7  $\mu$ mol, 10 mol%) zugegeben und die Mischung 40 h bei 110 °C gerührt. Nach Zugabe des Liganden verfärbte sich die Lösung zunächst blau, wurde beim Erhitzen gelb und schließlich resultierte eine grün gefärbte Suspension. Es wurde Wasser sowie Dichlormethan zugegeben. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat aufgereinigt.

Ausbeute: 116 mg (64 % d.Th.) farbloser Schaum

<sup>1</sup>H-NMR: [600 MHz, 100 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>]  $\delta$  = 1.38 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 1.83 (m, 1H, Pro H( $\gamma$ )), 1.94 (m, 2H, Pro H( $\beta$ ,  $\gamma$ )), 2.23 (m, 1H, Pro H( $\beta$ )), 3.44 (m, 2H, Pro H( $\delta$ )), 4.38 (q, <sup>3</sup>*J* = 10.6, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.49 (dd, <sup>3</sup>*J* = 5.9 Hz, 1H, Pro H( $\alpha$ )), 7.72 (d, <sup>3</sup>*J* = 11.0 Hz, 1H, Apa H(3)), 7.92 (t, <sup>3</sup>*J* = 11.7 Hz, 1H, Apa H(4)), 8.23 (d, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 1H, Apa H(5)), 10.19 (s, 1H, NH) ppm

<sup>13</sup>C-NMR: [151 MHz, 100 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>]:  $\delta$  = 14.6 (CH<sub>3</sub>), 23.8 (Pro C( $\gamma$ )), 28.4(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.4 (Pro C( $\beta$ )), 47.0 (Pro C( $\delta$ )), 60.3 (CH<sub>2</sub>), 61.7 (Pro C( $\alpha$ )), 78.9(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 117.6 (Apa C(5)), 120.8 (Apa C(3)), 140.1 (Apa C(4)), 146.6 (Apa C(2)), 152.5 (Apa C(6)), 153.5 (COO<sup>t</sup>Bu), 164.8 (CO<sub>2</sub>Et), 173.3 (CO) ppm



---

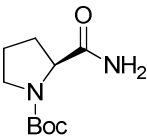
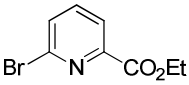
CHN-Analyse:	ber	C: 59.49 %	H: 6.93 %	N: 11.56 %	
	gef	C: 59.48 %	H: 6.77 %	N: 11.53 %	M <sub>w</sub> : 363.41
		$C_{18}H_{25}N_3O_5$			

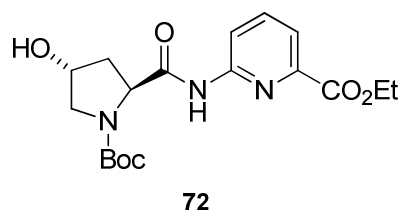
#### 6.4.48.2 Optimierung der Bedingungen

Für die Optimierung wurden Prolinamid **67**, 6-Brompicolinsäureethylester **68**, der Katalysator und die Base in ein Reaktionsgefäß eingewogen und nach Evakuieren und anschließendem Befüllen mit Argon zunächst Lösungsmittel (2 ml) und dann das frisch destillierte *N,N'*-Dimethylethylendiamin (1.5 µl, 14.1 µmol, ~ 30 mol%) zugegeben. Die Suspensionen wurden bei 110 °C gerührt. Nach 24 h wurden 200 µl der Lösung abgenommen, 800 µl Methanol (HPLC grade) zugegeben und die resultierende Mischung mittels analytischer HPLC untersucht. Nach 48 h wurde eine weitere Probe entnommen und auf die gleiche Art analysiert. Die Einwaagen der Reaktionspartner sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Die aus den Chromatogrammen gewonnenen Flächen wurden mit Hilfe des vorher bestimmten Responsefaktors multipliziert und so die Ausbeuten des Dipeptids bestimmt.

Tabelle 21 Einwaagen der Reaktionspartner für die Reaktionsoptimierung.

		 <b>67</b>	 <b>68</b>	CuI	Base
Toluol	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.6 mg 49.5 μmol	13.2 mg 57.4 μmol 1.16 equiv	0.5 mg ~ 5 mol%	13.5 mg 97.8 μmol 1.98 equiv
	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	9.6 mg 44.8 μmol	14.3 mg 62.1 μmol 1.38 equiv	0.9 mg ~ 10 mol%	22.2 mg 105 μmol 2.34 equiv
	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.2 mg 47.6 μmol	14.1 mg 61.3 μmol 1.29 equiv	0.5 mg ~ 5 mol%	31.4 mg 96.4 μmol 2.02 equiv
1,4-Dioxan	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.6 mg 49.5 μmol	13.1 mg 56.9 μmol 1.15 equiv	0.5 mg ~ 5 mol%	16.0 mg 115 μmol 2.32 equiv
	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10.6 mg 49.5 μmol	14.0 mg 60.8 μmol 1.23 equiv	0.9 mg ~ 10 mol%	24.0 mg 113 μmol 2.28 equiv
	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.1 mg 47.1 μmol	13.6 mg 59.1 μmol 1.25 equiv	0.5 mg ~ 5 mol%	38.2 mg 117 μmol 2.48 equiv

**6.4.48.3 Katalyse mit Hydroxyprolinamid**

Boc-Hyp-NH<sub>2</sub> **70** (115 mg, 0.50 mmol), 6-Brompicolinsäureethylester (127 mg, 0.55 mmol, 1.1 equiv), Kupfer(I)iodid (30.6 mg, 0.16 mmol, 30 mol%) sowie Kaliumcarbonat (138 mg, 1.00 mmol, 2 equiv) wurden in trockenem, entgastem Toluol (3 ml) gelöst bzw. suspendiert. Nach Zugabe von *N,N'*-Dimethylethylendiamin (34 µl, 0.32 mmol, 60 mol%) wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde zunächst das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und Dichlormethan (10 ml) sowie Wasser (10 ml) zu dem Rückstand gegeben. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde der wässrige Rückstand noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde noch einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Das Produkt wurde schließlich säulenchromatographisch mit Ethylacetat als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 120 mg (63 % d.Th.) farbloser Schaum

Die physikalischen Daten entsprechen denen unter 6.4.26.

## 6.5 Untersuchungen zur Iminbildung

### 6.5.1 Iminbildung mit einfachen Systemen

Für die Untersuchung der Iminbildung mit den verwendeten Aminen im NMR Maßstab wurde jeweils eine Stammlösung des Amins angesetzt. Von dieser wurden je 600  $\mu\text{l}$  in ein NMR-Röhrchen gefüllt und dann mit dem Aldehyd versetzt. Im Falle des Cyclopeptids **2** betrug die Konzentration der Stammlösung 2.5 mM, welche mit einer Stammlösung der Aldehyde **A** – **E** (0.2 M) versetzt wurde. Von Benzaldehyd wurden 3 equiv und von den Dialdehyden **B** – **E** jeweils 1.5 equiv zugegeben. Bei dem Dipeptid **62** betrug die Konzentration der Stammlösung 50 bzw. 25 mM, bei dem Prolinderivat **65** 50 mM. Bei diesen Testansätzen wurde Benzaldehyd (1 equiv) in reiner Form zugesetzt. Als Lösungsmittel dienten MeOD, DMSO- $d_6$  und Acetonitril- $d_3$ . Die Lösungen wurden 18 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren aufgenommen wurden. Anschließend wurde gegebenenfalls entweder drei Körnchen Molsieb 4 Å, 10 mol% TFA oder im Falle des Cyclopeptids 1 equiv Natriumsulfat zugegeben. Dann wurden erneut nach weiteren 3 h  $^1\text{H}$ -NMR Spektren angefertigt.

### 6.5.2 Iminbildung nach Nitschke

Konzentrationen der Stammlösungen:

- 2-Formylpyridin: 0.1 M (3.80 mg, 35.5  $\mu\text{mol}$  in DMSO- $d_6$  (355  $\mu\text{l}$ ))
- $\text{FeCl}_2$ : 0.2 M (1.50 mg, 7.54  $\mu\text{mol}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  (37.7  $\mu\text{l}$ ))
- $\text{Fe}(\text{BF}_4)_2$ : 0.2 M (3.63 mg, 10.7  $\mu\text{mol}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  (53.3  $\mu\text{l}$ ))

Die Reaktionen zwischen Cyclopeptid **2** und 2-Formylpyridin in Gegenwart von Eisen(II)salzen wurde ebenfalls im NMR-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde **2** direkt in die NMR Röhrchen eingewogen (1.6 mg, 1.76  $\mu\text{mol}$ ), in MeOD, DMSO- $d_6$  oder Acetonitril- $d_3$  (500  $\mu\text{l}$ , 3.5 mM) gelöst bzw. suspendiert und mit der 2-Formylpyridinlösung (52.8  $\mu\text{l}$ , 5.28  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv) versetzt. Anschließend wurde jeweils noch ein Eisen(II)salz (8.8  $\mu\text{l}$ , 17.6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv) zugegeben und über Nacht stehen gelassen. Dann wurden die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der Lösungen aufgenommen. Exemplarisch sind im Anhang die Spektren der reinen Komponenten sowie der Reaktionslösungen in DMSO- $d_6$  abgebildet.

Als Referenz wurde in einem NMR Röhrchen tren (5.1  $\mu\text{l}$ , 27.3  $\mu\text{mol}$ ) und 2-Formylpyridin (7.8  $\mu\text{l}$ , 81.9  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv) in DMSO- $d_6$  (500  $\mu\text{l}$ ) gelöst, mit einem Körnchen  $\text{Fe}(\text{BF}_4)_2$  versetzt und das  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum aufgenommen (Anhang). In diesem Spektrum ist im Unterschied zu den anderen das Signal der Iminprotonen bei 8.57 ppm sichtbar.

### 6.5.3 Reduktive Aminierung

Cyclopeptid **2** (63.1 mg, 69.3  $\mu\text{mol}$ ) wurde zusammen mit Natriumcyanoborhydrid (9.2 mg, 146  $\mu\text{mol}$ , 2.1 equiv) unter Stickstoff in trockenem Methanol (50 ml) gelöst, mit Benzaldehyd (20.3  $\mu\text{l}$ , 201  $\mu\text{mol}$ , 2.9 equiv) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Eisbad wurde destilliertes Wasser (20 ml) zugegeben und weitere 20 h gerührt. Dann wurde Wasser zugegeben bis ein weißer Feststoff ausfiel, welcher durch Zentrifugieren und Abdekantieren abgetrennt wurde. Das Lösungsmittel der Lösung wurde entfernt, der Rückstand in wenig Methanol HPLC grade gelöst und über präparative HPLC gereinigt. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abb. 84 dargestellt.

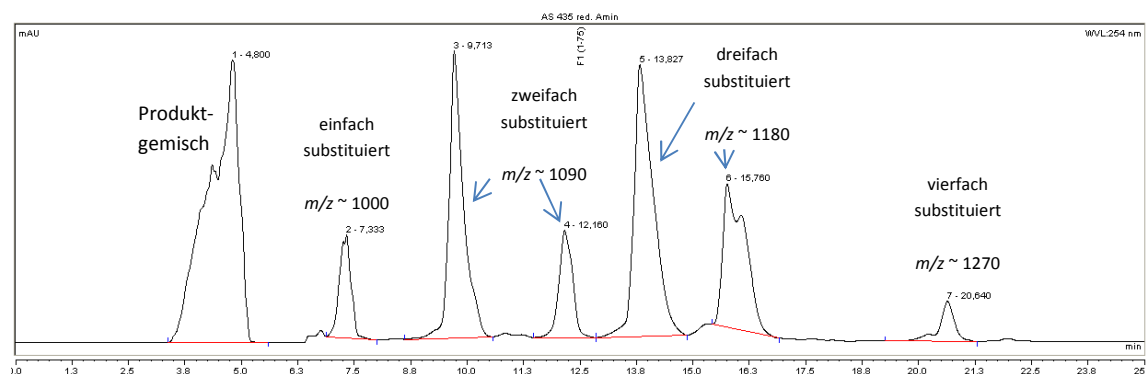


Abb. 84: HPLC Chromatogramm der reduktiven Aminierung in Methanol.

Gradient für HPLC Elution:

Säule: Supelco Ascentis® C18-Säule (25 cm x 21.2 mm, 5  $\mu\text{m}$ )

UV-Detektion: 254 nm

Fluß: 10 ml/min

Tabelle 22 Lösungsmittelgradient für die Aufreinigung des Bis(cyclopeptids) **48**

t / min	Wasser (0.1 % TFA) / %	ACN (0.1 % TFA) / %
0	80	20
37	60	40
41	50	50
47	50	50
53	80	20
55	80	20

## 7 Anhang

### 7.1 ITC

Zum Vergleich mit den Daten in Kapitel 2 (Synthese und Untersuchung eines wasserlöslichen Cyclopeptids) sind in den folgenden Tabellen thermodynamische Parameter der einzelnen untersuchten Komplexe aufgeführt, bei deren Berechnung aus den erhaltenen Bindungsisothermen der Stöchiometriefaktor  $n$  während der nicht-linearen Regression mit angepasst wurde.

Tabelle 23 Thermodynamische Daten der Bildung der Sulfat- und Tosylatkomplexe von **20** und **37** in Wasser/Methanol 1:1 (v/v) bei 298.1 K.

	<b>20</b>		<b>37</b>	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOTs	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>a</sup>	NaOTs <sup>a</sup>
$n$	0.70 ± 0.05	0.80 ± 0.02	0.62	0.79
$\log K_a$	3.82 ± 0.07	3.27 ± 0.02	3.56	3.06
$\Delta G^0$ / kJ/mol	-21.81 ± 0.43	-18.68 ± 0.11	-20.32	-17.46
$\Delta H^0$ / kJ/mol	-16.22 ± 1.88	-24.16 ± 1.58	-20.43	-13.51
$T\Delta S^0$ / kJ/mol	5.59 ± 1.93	-5.49 ± 1.68	-0.10	3.96

c(CP) = 1 mM, c(Gast) = 20 mM, c(Puffer) = 20 mM, <sup>a</sup> nur jeweils eine Messung durchgeführt

Tabelle 24 Thermodynamische Daten der Bildung der Sulfat- und Tosylatkomplexe von **2**·3HCl bzw. des Sulfatkomplexes von **38** in Wasser/Methanol 1:1 (v/v) (20 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa) bei 298.1 K und pH 4.8.

	<b>2</b> ·3HCl		<b>38</b>
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOTs	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
n	0.85 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.63 ± 0.16
log K <sub>a</sub>	5.10 ± 0.04	2.61 ± 0.12	2.25 ± 0.05
ΔG <sup>0</sup> / kJ/mol	-29.13 ± 0.24	-14.90 ± 0.11	-12.84 ± 0.26
ΔH <sup>0</sup> / kJ/mol	-13.09 ± 0.42	-27.40 ± 6.05	-19.76 ± 6.11
TΔS <sup>0</sup> / kJ/mol	16.05 ± 0.60	-12.49 ± 6.09	-6.92 ± 6.37

c(CP) = 1 mM, c(Gast) = 20 mM, c(Puffer) = 20 mM

Tabelle 25 Thermodynamische Parameter der Bildung des Sulfatkomplexes von **2**·3HCl in Wasser in Anwesenheit verschiedener Puffersalze bei unterschiedlichen pH-Werten bei 298.1 K.

Puffer bzw. Salz	pH	log K <sub>a</sub>	ΔH <sup>0</sup> / kJ/mol	TΔS <sup>0</sup> / kJ/mol	n
AcOH/NaOAc <sup>a</sup>	4.8	4.2 ± 0.1	-13.5 ± 0.1	10.5 ± 0.1	0.88 ± 0.01
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	7.0	2.3 ± 0.1	-6.2 ± 0.2	7.0 ± 0.2	0.60 ± 0.03
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>a</sup>	4.6	3.5 ± 0.1	-6.7 ± 0.9	13.2 ± 0.7	0.82 ± 0.09
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>a</sup>	2.3	3.7 ± 0.1	-9.5 ± 0.9	11.8 ± 0.8	0.76 ± 0.02
NaCl <sup>c</sup>	3.8	2.8 ± 0.1	-4.9 ± 0.4	11.1 ± 0.3	0.89 ± 0.01

<sup>a</sup> c(CP) = 1 mM, c(Gast) = c(Salz) = 20 mM, <sup>b</sup> c(CP) = 2.5 mM, c(Gast) = c(Salz) = 50 mM, <sup>c</sup> c(CP) = 2.5 mM, c(Gast) = 50 mM, c(Salz) = 0.15 M



## 7.2 Responsefaktor

Für die Auswertung der Kupplungsreaktionen zwischen **67** und **68** wurde ein Responsefaktor des Produkts für die HPLC Analyse bestimmt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit dem analysenreinen Dipeptid **69** angefertigt und von den einzelnen Lösungen mittels analytischer HPLC die zugehörigen Chromatogramme aufgenommen. Über die Auftragung der erhaltenen Peakflächen in den Chromatogrammen gegen die Stoffmenge gefolgt von linearer Regression der Punkte wurde der Faktor R bestimmt.

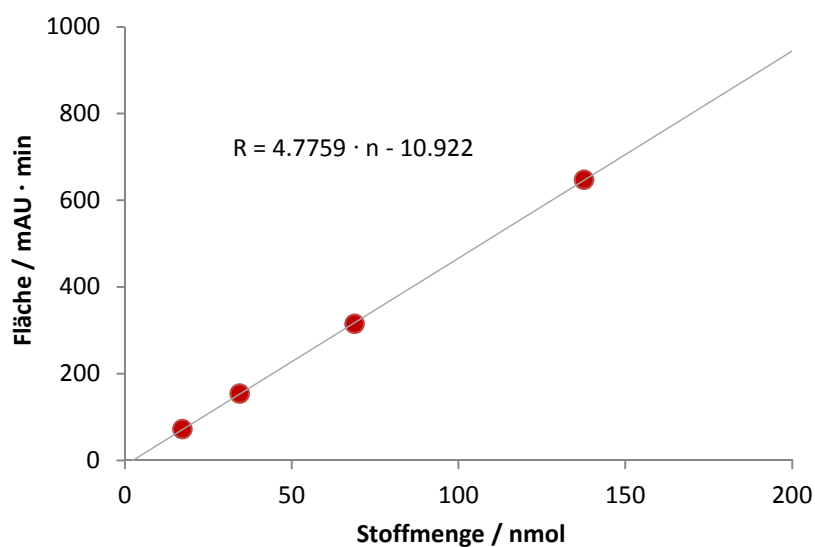
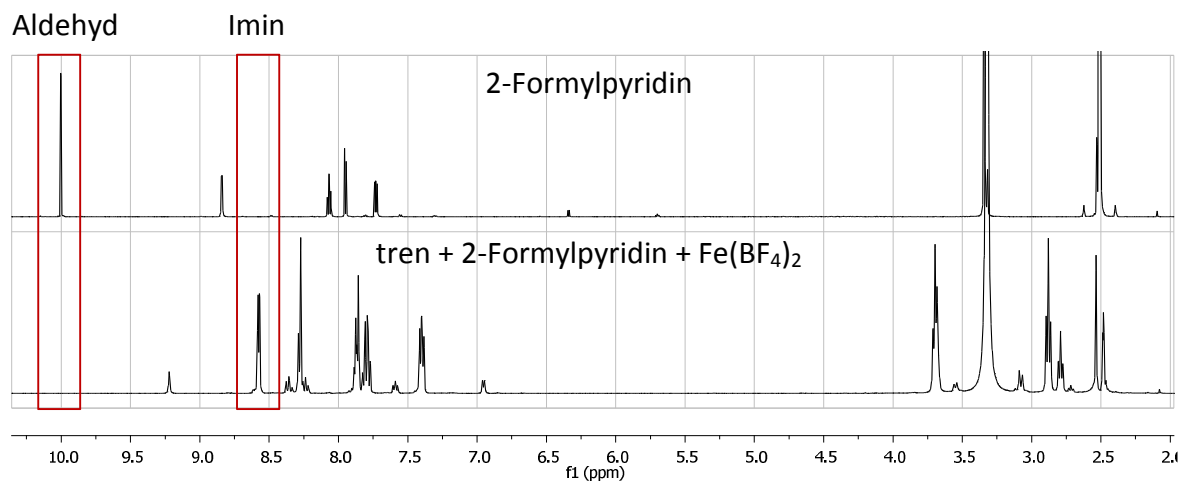


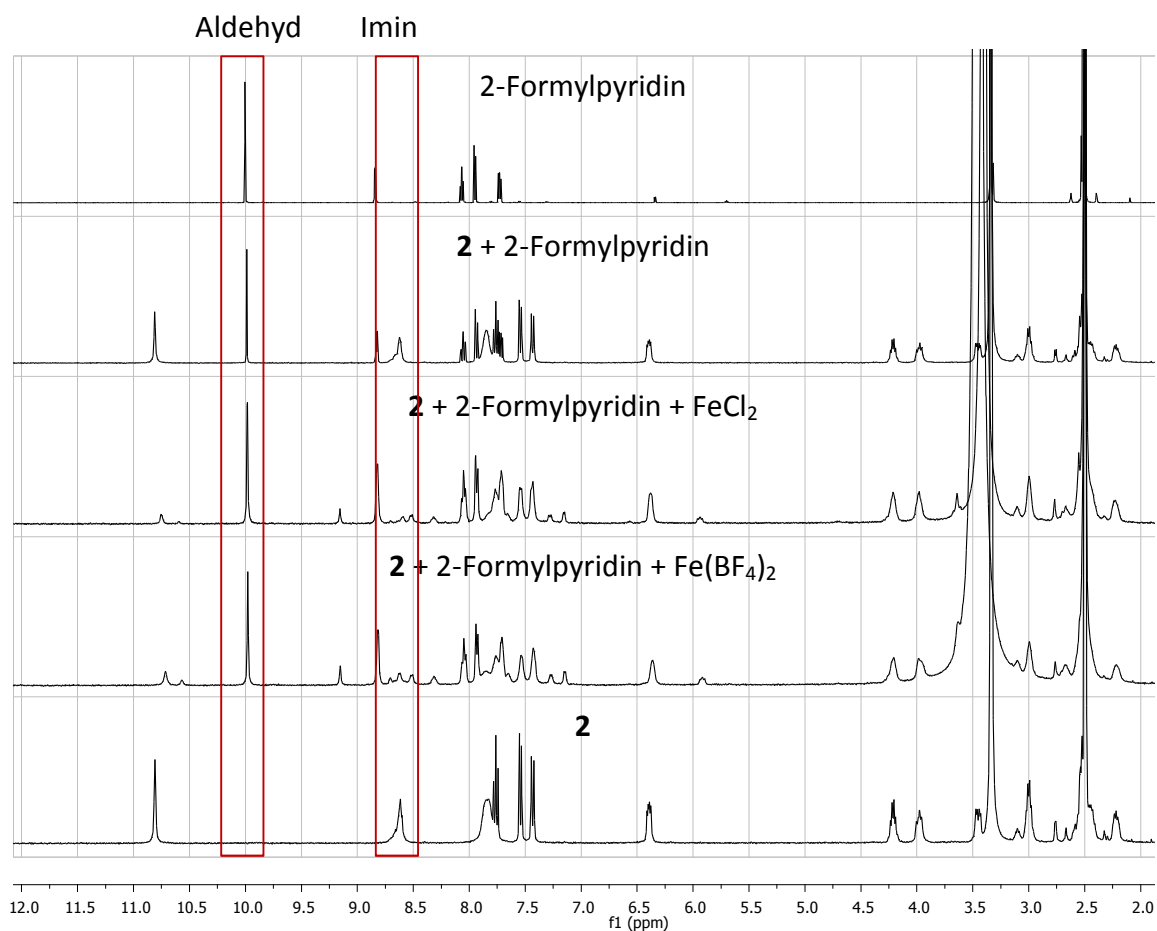
Abb. 85: Bestimmung des Responsefaktors R für Dipeptid **69**.

### 7.3 $^1\text{H}$ -NMR Spektren

#### 7.3.1 Reaktion zwischen tren und 2-Formylpyridin in $\text{DMSO-}d_6$



#### 7.3.2 Reaktion zwischen 2 und 2-Formylpyridin mit Eisen(II)salzen in $\text{DMSO-}d_6$



## 8 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Smith, C. D. Cappa, K. R. Wilson, B. M. Messer, R. C. Cohen, R. J. Saykally, *Science* **2004**, *306*, 851-853.
- [2] P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann, H. E. Stanley, *Nature* **1992**, *360*, 324-328.
- [3] T. Pavlidis, W. Kauzmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *132*, 338-348.
- [4] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- [5] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 98-104.
- [6] L. G. Lange, J. F. Riordan, B. L. Vallee, *Biochemistry* **1974**, *13*, 4361-4370.
- [7] a.) C. H. Park, H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2431-2432; b.) C. H. Park, H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2429-2431.
- [8] B. Dietrich, M. W. Hosseini, J. M. Lehn, R. B. Sessions, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1282-1283.
- [9] F. Hofmeister, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247-260.
- [10] D. W. Smith, *J. Chem. Educ.* **1977**, *54*, 540.
- [11] E. A. Katayev, Y. A. Ustynyuk, J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3004-3037.
- [12] H. D. Schreiber, R. W. Fowler, C. C. Ward, *Phys. Chem. Glasses* **1993**, *34*, 66-70.
- [13] H. Weingärtner, E. U. Franck, G. Wiegand, N. Dahmen, G. Schwedt, F. H. Frimmel, B. C. Gordalla, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2000**.
- [14] B. Gao, Z. F. Liu, *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 8299-8306.
- [15] J. W. Pflugrath, F. A. Quirocho, *J. Mol. Biol.* **1988**, *200*, 163-180.
- [16] a.) K. Bowman-James, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 671-678; b.) S. O. Kang, R. A. Begum, K. Bowman-James, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7882-7894.
- [17] a.) T. Clifford, A. Danby, J. M. Llinares, S. Mason, N. W. Alcock, D. Powell, J. A. Aguilar, E. García-España, K. Bowman-James, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 4710-4720; b.) J. Nelson, M. Nieuwenhuyzen, I. Pal, R. M. Town, *Dalton Trans.* **2004**, 2303-2308.
- [18] C. J. Fowler, T. J. Haverlock, B. A. Moyer, J. A. Shriver, D. E. Gross, M. Marquez, J. L. Sessler, M. A. Hossain, K. Bowman-James, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14386-14387.
- [19] L. R. Eller, M. Stępień, C. J. Fowler, J. T. Lee, J. L. Sessler, B. A. Moyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11020-11021.
- [20] R. Custelcean, A. Bock, B. A. Moyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7177-7185.
- [21] D. K. Cabbiness, D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6540-6541.
- [22] a.) J. Bitta, S. Kubik, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2637-2640; b.) J. Bitta, S. Kubik, *J. Supramol. Chem.* **2001**, *1*, 293-297.
- [23] a.) K. Cammann, *Biomimetic and Bioorganic Chemistry*, Vol. 128, Springer Berlin Heidelberg, **1985**, 219-259; b.) L. Rose, A. T. A. Jenkins, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 387-393.
- [24] a.) M. E. Rateb, R. Ebel, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 290-344; b.) J. W. Blunt, B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. G. Munro, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 144-222.
- [25] Z. Jin, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1143-1191.
- [26] P. Wipf, C. P. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10975-10977.
- [27] P. Wipf, C. Wang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2381-2384.
- [28] P. Wipf, C. P. Miller, C. M. Grant, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9143-9150.

- [29] a.) D. Mink, S. Mecozzi, J. Rebek Jr, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5709-5712; b.) C. Boss, P. H. Rasmussen, A. R. Wartini, S. R. Waldvogel, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6327-6331.
- [30] Á. Pintér, G. Haberhauer, *Synlett* **2009**, 2009, 3082-3098.
- [31] M. Schnopp, S. Ernst, G. Haberhauer, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 213-222.
- [32] P. G. Young, J. K. Clegg, K. A. Jolliffe, *Supramol. Chem.* **2011**, 24, 77-87.
- [33] P. G. Young, K. A. Jolliffe, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 2664-2672.
- [34] H. T. Ngo, X. Liu, K. A. Jolliffe, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4928-4965.
- [35] S. J. Butler, K. A. Jolliffe, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 3471-3483.
- [36] S. J. Butler, K. A. Jolliffe, *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 2621-2628.
- [37] X. Li, Y.-D. Wu, D. Yang, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1428-1438.
- [38] S. Kubik, R. Goddard, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 9475-9486.
- [39] M. Zengerle, *Diplomarbeit*, Technische Universität Kaiserslautern **2009**.
- [40] T. R. Kelly, F. Lang, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 4623-4633.
- [41] O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40, 2380-2382.
- [42] N. G. Anderson, D. A. Lust, K. A. Colapret, J. H. Simpson, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7955-7958.
- [43] S. Stüwe, *Dissertation*, Technische Universität Kaiserslautern **2007**.
- [44] M. Adamczyk, J. R. Fishpaugh, P. G. Mattingly, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8345-8346.
- [45] M. Przybylski, M. O. Glocker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 806-826.
- [46] a.) E. B. Hughes, H. H. G. Jellinek, B. A. Ambrose, *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* **1948**, 53, 410-414; b.) H. Bayzer, *Monatsh. Chem.* **1957**, 88, 72-77.
- [47] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, 43, 1739-1753.
- [48] a.) S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12752-12760; b.) C. Reyheller, B. P. Hay, S. Kubik, *New J. Chem.* **2007**, 31, 2095-2102.
- [49] Z. Rodriguez-Docampo, S. I. Pascu, S. Kubik, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11206-11210.
- [50] B. L. Jacobson, F. A. Quioco, *J. Mol. Biol.* **1988**, 204, 783-787.
- [51] H. Luecke, F. A. Quioco, *Nature* **1990**, 347, 402-406.
- [52] S. Kubik, R. Goddard, S. Otto, S. Pohl, C. Reyheller, S. Stüwe, *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 20, 2364-2375.
- [53] S. Otto, S. Kubik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7804-7805.
- [54] Z. Rodriguez-Docampo, E. Eugenieva-Ilieva, C. Reyheller, A. M. Belenguer, S. Kubik, S. Otto, *Chem. Comm.* **2011**, 47, 9798-9800.
- [55] E. P. Eugenieva-Ilieva, *Dissertation*, Technische Universität Kaiserslautern **2013**.
- [56] T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel, S. Kubik, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 7241-7255.
- [57] D. J. Cram, S. Karbach, Y. H. Kim, L. Baczynskyj, G. W. Kallemeyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 2575-2576.
- [58] S. Kubik, *Chemistry of Nanocontainers, Vol. 319* (Eds.: M. Albrecht, E. Hahn), Springer Berlin Heidelberg, **2012**, 1-34.
- [59] T. A. Bewley, C. H. Li, *Int. J. Prot. Res.* **1969**, 1, 117-124.
- [60] S. Otto, *Persönliche Mitteilung*, **2011**.
- [61] L. D. Small, J. H. Bailey, C. J. Cavallito, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1710-1713.
- [62] Y. Wang, J. H. Espenson, *J. Org. Chem.* **1999**, 65, 104-107.
- [63] L. C. Jones, W. M. Lackowski, Y. Vasilyeva, K. Wilson, V. Chechik, *Chem. Comm.* **2009**, 1377-1379.
- [64] L. Vial, R. F. Ludlow, J. Leclaire, R. Pérez-Fernández, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10253-10257.

- [65] P. E. Hansen, A. E. Hansen, A. Lycka, A. Buvári-Barcza, *Acta Chem. Scand.* **1993**, 47, 777-788.
- [66] S. Scheiner, M. Čuma, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1511-1521.
- [67] I. Huc, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 2106-2110.
- [68] N. Giuseppone, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 1715-1722.
- [69] a.) M. D. Pluth, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 1650-1659; b.) J. I. van der Vlugt, T. S. Koblenz, J. Wassenaar, J. N. H. Reek, *Molecular Encapsulation*, John Wiley & Sons, Ltd, **2010**, 145-174; c.) R. Warmuth, *Molecular Encapsulation*, John Wiley & Sons, Ltd, **2010**, 227-268; d.) D. Ajami, J. Rebek, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 46, 990-999.
- [70] a.) D. J. Cram, M. E. Tanner, R. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 30, 1024-1027; b.) R. Warmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 1347-1350; c.) R. Warmuth, M. A. Marvel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1117-1119; d.) M. Ziegler, J. L. Brumaghim, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4119-4121; e.) J.-L. Kerdelhué, K. J. Langenwalter, R. Warmuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 125, 973-986; f.) R. Warmuth, S. Makowiec, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1084-1085; g.) R. Warmuth, S. Makowiec, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1233-1241.
- [71] a.) J. Kang, J. Rebek, *Nature* **1997**, 385, 50-52; b.) J. Kang, J. Santamaría, G. Hilmerston, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7389-7390; c.) J. Chen, J. Rebek, *Org. Lett.* **2002**, 4, 327-329; d.) R. Warmuth, J.-L. Kerdelhué, S. Sánchez Carrera, K. J. Langenwalter, N. Brown, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 96-99; e.) D. Fiedler, H. van Halbeek, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10240-10252; f.) M. D. Pluth, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *Science* **2007**, 316, 85-88; g.) C. J. Hastings, M. D. Pluth, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6938-6940; h.) P. Kovaříček, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9446-9455.
- [72] a.) Y. Nishioka, T. Yamaguchi, M. Yoshizawa, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7000-7001; b.) Y. Nishioka, T. Yamaguchi, M. Kawano, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8160-8161; c.) T. Murase, S. Horiuchi, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2866-2867.
- [73] a.) L. S. Kaanumalle, C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, V. Ramamurthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3674-3675; b.) M. Yoshizawa, M. Tamura, M. Fujita, *Science* **2006**, 312, 251-254; c.) C. L. D. Gibb, A. K. Sundaresan, V. Ramamurthy, B. C. Gibb, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4069-4080.
- [74] J. Sun, R. Warmuth, *Chem. Comm.* **2011**, 47, 9351-9353.
- [75] X. Liu, Y. Liu, G. Li, R. Warmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 901-904.
- [76] a.) D. Schultz, J. R. Nitschke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 11191-11195; b.) D. Schultz, J. R. Nitschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2453-2456.
- [77] P. Mal, D. Schultz, K. Beyeh, K. Rissanen, J. R. Nitschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8297-8301.
- [78] a.) P. Mal, B. Breiner, K. Rissanen, J. R. Nitschke, *Science* **2009**, 324, 1697-1699; b.) I. A. Riddell, M. M. J. Smulders, J. K. Clegg, J. R. Nitschke, *Chem. Comm.* **2011**, 47, 457-459.
- [79] R. A. Bilbeisi, J. K. Clegg, N. Elgrishi, X. d. Hatten, M. Devillard, B. Breiner, P. Mal, J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 134, 5110-5119.
- [80] Y. R. Hristova, M. M. J. Smulders, J. K. Clegg, B. Breiner, J. R. Nitschke, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 638-641.
- [81] a.) T. K. Ronson, S. Zarra, S. P. Black, J. R. Nitschke, *Chem. Comm.* **2013**, 49, 2476-2490; b.) M. M. J. Smulders, I. A. Riddell, C. Browne, J. R. Nitschke, *Chem. Soc. Rev.* **2013**.

- [82] F. H. Westheimer, K. Taguchi, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1570-1572.
- [83] S. Le Gac, N. Monnier-Benoit, L. D. Metoul, S. Petit, I. Jabin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 139-145.
- [84] W. Ho-Hsiang, H. Ching-Sung, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1981**, *43*, 2299-2300.
- [85] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897-2904.
- [86] E. J. Schwoegler, H. Adkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 3499-3502.
- [87] a.) W. Eschweiler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 880-882; b.) H. T. Clarke, H. B. Gillespie, S. Z. Weisshaus, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 4571-4587.
- [88] B. A. Bunin, *The Combinatorial Index*, Academic Press, San Diego, **1998**, 77-212.
- [89] K. Seno, T. Okuno, K. Nishi, Y. Murakami, K. Yamada, S. Nakamoto, T. Ono, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 587-590.
- [90] H. Charville, D. Jackson, G. Hodges, A. Whiting, *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 1813-1823.
- [91] B. S. Jursic, Z. Zdravkovski, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2761-2770.
- [92] a.) E. Gelens, L. Smeets, L. A. J. M. Sliedregt, B. J. van Steen, C. G. Kruse, R. Leurs, R. V. A. Orru, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3751-3754; b.) X. J. Wang, Q. Yang, F. Liu, Q. D. You, *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 1028-1035.
- [93] L. J. Gooßen, D. M. Ohlmann, P. P. Lange, *Synthesis* **2009**, *2009*, 160-164.
- [94] a.) A. Pelter, T. E. Levitt, P. Nelsoni, *Tetrahedron* **1970**, *26*, 1539-1544; b.) G. Trapani, A. Reho, A. Latrofa, *Synthesis* **1983**, *12*, 1013-1014.
- [95] J. D. Wilson, H. Weingarten, *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 983-986.
- [96] S. Chung, D. P. Uccello, H. Choi, J. I. Montgomery, J. Chen, *Synlett* **2011**, *2011*, 2072-2074.
- [97] a.) T. Ozturk, E. Ertas, O. Mert, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007**, *107*, 5210-5278; b.) D. R. M. de Moreira, *Synlett* **2008**, *2008*, 463-464.
- [98] T. Nagashima, Y. Lu, M. J. Petro, W. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6585-6588.
- [99] T. Wieland, H. U. Lang, D. Liebsch, *Liebigs Ann. Chem.* **1955**, *597*, 227-234.
- [100] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.
- [101] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [102] C. Haase, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1553-1556.
- [103] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526-533.
- [104] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248-9252.
- [105] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [106] a.) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143; b.) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [107] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.
- [108] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116.
- [109] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252.
- [110] N. Carrillo, E. A. Davalos, J. A. Russak, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1452-1453.
- [111] a.) M. Hosseini-Sarvari, H. Sharghi, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6652-6654; b.) A. Chandra Shekhar, A. Ravi Kumar, G. Sathaiah, V. Luke Paul, M. Sridhar, P. Shanthan Rao, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7099-7101.
- [112] a.) R. Arora, S. Paul, R. Gupta, *Can. J. Chem.* **2005**, *83*, 1137-1140; b.) C. Han, J. P. Lee, E. Lobkovsky, J. A. Porco, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10039-10044.
- [113] a.) C. Gunanathan, Y. Ben-David, D. Milstein, *Science* **2007**, *317*, 790-792; b.) Y. Zhang, C. Chen, S. C. Ghosh, Y. Li, S. H. Hong, *Organometallics* **2010**, *29*, 1374-1378.
- [114] a.) K. Ekoue-Kovi, C. Wolf, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6302-6315; b.) Y. Suto, N. Yamagiwa, Y. Torisawa, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5732-5735; c.) C. Qian, X. Zhang, Y. Zhang, Q. Shen, *J. Organomet. Chem.* **2010**, *695*, 747-752.

- [115] a.) S. Murahashi, T. Naota, E. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7846-7847; b.) C. J. Copley, M. van den Heuvel, A. Abbadi, J. G. de Vries, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2467-2470; c.) E. Callens, A. J. Burton, A. G. M. Barrett, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8699-8701; d.) C. L. Allen, A. A. Lapkin, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4262-4264.
- [116] a.) A. Mishra, A. Ali, S. Upreti, R. Gupta, *Inorg. Chem.* **2007**, *47*, 154-161; b.) C. Ramalingan, Y.-T. Park, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4536-4538; c.) C. L. Allen, S. Davulcu, J. M. J. Williams, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5096-5099.
- [117] a.) A. Schoenberg, R. F. Heck, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3327-3331; b.) J. R. Martinelli, T. P. Clark, D. A. Watson, R. H. Munday, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8460-8463; c.) J. R. Martinelli, D. A. Watson, D. M. M. Freckmann, T. E. Barder, S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7102-7107; d.) L. R. Odell, J. Sävmarker, M. Larhed, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6115-6118.
- [118] J. Yin, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1101-1104.
- [119] J. Yin, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6043-6048.
- [120] B. P. Fors, K. Dooleweerd, Q. Zeng, S. L. Buchwald, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6576-6583.
- [121] K. Dooleweerd, B. P. Fors, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2350-2353.
- [122] X. Huang, K. W. Anderson, D. Zim, L. Jiang, A. Klapars, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6653-6655.
- [123] F. Ullmann, J. Bielecki, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2174-2185.
- [124] F. Ullmann, P. Sponagel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 2211-2212.
- [125] F. Ullmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2382-2384.
- [126] I. Goldberg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 1691-1692.
- [127] I. Goldberg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 4541-4546.
- [128] A. Klapars, J. C. Antilla, X. Huang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7727-7729.
- [129] A. Klapars, X. Huang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7421-7428.
- [130] M. Mansour, R. Giacomazzi, A. Ouali, M. Taillefer, A. Jutand, *Chem. Comm.* **2008**, 6051-6053.
- [131] a.) W. R. Bowman, H. Heaney, P. H. G. Smith, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5821-5824; b.) R. Xifra, X. Ribas, A. Llobet, A. Poater, M. Duran, M. Solà, T. D. P. Stack, J. Benet-Buchholz, B. Donnadieu, J. Mahía, T. Parella, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5146-5156; c.) L. M. Huffman, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9196-9197.
- [132] L. Jiang, S. L. Buchwald, *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2008**, 699-760.
- [133] a.) R. G. R. Bacon, H. A. O. Hill, *J. Chem. Soc.* **1964**, 1097-1107; b.) R. G. R. Bacon, H. A. O. Hill, *J. Chem. Soc.* **1964**, 1108-1112; c.) R. G. R. Bacon, H. A. O. Hill, *J. Chem. Soc.* **1964**, 1112-1119.
- [134] H. Weingarten, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3624-3626.
- [135] R. W. Turner, E. L. Amma, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 4046-4047.
- [136] E. R. Strieter, B. Bhayana, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 78-88.
- [137] E. R. Strieter, D. G. Blackmond, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4120-4121.
- [138] T. L. Ramus, S. J. Hein, L. C. Thomas, *J. Chromatogr. A* **1987**, *404*, 155-162.
- [139] X. Guo, H. Rao, H. Fu, Y. Jiang, Y. Zhao, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2197-2202.
- [140] C. Heindl, H. Hübner, P. Gmeiner, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3153-3172.
- [141] M. Schaubel, *Staatsexamensarbeit*, Technische Universität Kaiserslautern **2011**.
- [142] S. V. Ley, A. W. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5400-5449.

- [143] M. Fontanelli, M. Micheloni, in *First Spanish Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes*, Peñíscola, Spain, **1990**.
- [144] a.) G. Gran, *Analyst* **1952**, 77, 661-671; b.) F. J. C. Rossotti, H. Rossotti, *J. Chem. Educ.* **1965**, 42, 375.
- [145] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1195-1200.
- [146] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311-318.
- [147] J.-C. Bollinger, G. Yvernault, T. Yvernault, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. C.* **1978**, 287, 519-521.
- [148] S. R. Wilson, R. N. Misra, G. M. Georgiadis, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 2460-2468.
- [149] Y. Ozari, J. Jagur-Grodzinski, *Chem. Comm.* **1974**, 0, 295-296.
- [150] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2437-2446.
- [151] J. R. Malpass, D. A. Hemmings, A. L. Wallis, S. R. Fletcher, S. Patel, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **2001**, 1044-1050.
- [152] M. Ioele, G. Ortaggi, M. Scarsella, G. Sleiter, *Polyhedron* **1991**, 10, 2475-2476.
- [153] H. Meyer, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1925**, 44, 323-328.
- [154] A. Zafar, S. J. Geib, Y. Hamuro, A. J. Carr, A. D. Hamilton, *Tetrahedron* **2000**, 56, 8419-8427.
- [155] A. Janecka, T. Janecki, S.-M. Shan, C. Bowers, K. Folkers, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2238-2241.
- [156] C. Reyheller, *Dissertation*, Technische Universität Kaiserslautern **2007**.
- [157] M. Tamaki, G. Han, V. J. Hruby, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3593-3596.
- [158] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron* **1996**, 52, 15017-15030.



## **LEBENS LAUF**

### **Schulische Ausbildung**

08/1993 – 06/2002	Von-der-Leyen-Gymnasium, Blieskastel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/1991 – 07/1993	Becker-Gundahl-Schule, Ballweiler
08/1989 – 07/1991	Waldorfschule Bexbach

### **Studium**

06/2008 – 07/2013	Doktorarbeit in der Gruppe von Prof. S. Kubik, Technische Universität Kaiserslautern, Themenbereich: Molekulare Erkennung Titel: Entwicklung von Anionenrezeptoren auf Basis von Cyclopeptiden und Bis(cyclopeptiden)
08/2007 – 05/2008	Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. S. Kubik, Technische Universität Kaiserslautern, Themenbereich: Molekulare Erkennung Titel: Arbeiten zur Synthese ditoper Anionenrezeptoren mit einer Cyclopeptid- und einer Rutheniumtrisbipyridyl-untereinheit
10/2002 – 05/2008	Studium im Fachbereich Chemie, Technische Universität Kaiserslautern

### **Sonstiges**

September 2012	Auslandspraktikum in der Gruppe von Prof. E. García-España, Universidad de Valencia
Oktober 2001	Praktikum bei der Firma Trespaphan in Neunkirchen Abteilung: Forschung und Entwicklung